

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INHIBITION DE LA SYNTHÉTASE DES ACIDES GRAS PAR
LES ACIDES GRAS À CHAÎNE MOYENNE (MCFA)
SUR DES HÉPATOCYTES D'EMBRYON DE POULET

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
SABINE SAWADOGO

SEPTEMBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Un vieux paysan avait un cheval. Un jour l'animal s'enfuit et ne rentre pas. Son voisin lui dit : "Quelle peine de voir partir un si beau cheval". L'homme répond : " Peine ou joie, je ne sais ? ".

Et voila que quinze jours plus tard, le cheval revient à la ferme suivi d'une douzaine de chevaux. Son voisin dit alors au vieux paysan : "Quelle joie pour toi !" Il déclare : "Joie ou peine, je ne sais pas ?".

Le fils du paysan saute sur une des montures et part épouvanté, tombe et se casse une jambe. "Pour sûr, c'est une grande peine pour toi" de lui dire son voisin étant assuré de sa réponse. Le père hoche la tête et dit : "Peine ou joie, je ne sais ?".

La guerre civile faisait rage dans la province. Une armée de soldats passe et emmène de force tous les jeunes gens en âge de porter un fusil. Seul le garçon à la jambe brisée ne part pas. Joie ou peine ? Qui pouvait le dire ?

On ne sait jamais si tel évènement est joie ou peine. Il faut attendre la fin de l'histoire et peut-être même la fin de la vie. Alors, en se retournant, on verra mieux ce qu'il en était.

REMERCIEMENTS

Le présent mémoire représente le travail effectué pendant les deux dernières années. Il n'aurait pu être effectué sans le soutien de tous.

Aussi, je voudrais en premier lieu remercier ma directrice de recherche Dr Catherine Mounier pour m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire et aussi pour m'avoir encadrée au cours de ces années, m'introduisant ainsi dans le monde bien difficile mais fascinant et enrichissant de la recherche.

Je remercie vivement les membres des comités, Dr Mario Houde et Dr Julie Lafond , Dr Louise Brissette et Dr Benoît Barbeau dont les suggestions et recommandations ont permis d'affiner les travaux.

Je remercie le Dr Normand Chevrier dont les conseils ont été précieux dans la mise au point de l'essai enzymatique.

Je remercie le Dr Tatiana Scorza pour les recommandations d'écriture.

Je suis particulièrement reconnaissante aux techniciens de laboratoire, particulièrement France et Josée pour leur assistance technique mais aussi leur soutien pendant ces deux années.

Un très grand merci à tous ceux et celles qui ont été mes collègues de laboratoire, Omar Arfa, Caroline Martel, Anne Radenne, et Gabriel Rocque sans oublier les stagiaires que j'ai pu côtoyer durant ma formation.

Je remercie tout le département de biologie de l'UQAM, les collègues de cours, et les collègues de Bio-Med pour le soutien dont j'ai bénéficié au cours de ma formation.

Enfin je remercie chaleureusement ma famille et mon fiancé qui m'ont soutenu moralement. Je leur suis particulièrement reconnaissante pour leur patience et leurs encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
RÉSUMÉ.....	xviii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	5
<i>SECTION I - MÉTABOLISME DES ACIDES GRAS</i>	6
1.1.A Synthèse hépatique.....	6
1.1.A.1 Initiation de la synthèse des acides gras.....	6
1.1.A.2 Protéine de l'acide gras synthase (FAS)	10
1.1.A.3 Réactions catalysées par la FAS.....	13

1.1.B	Transformation des acides gras.....	16
1.1.B.1	Désaturation.....	16
1.1.B.2	Estérification des acides gras.....	16
1.1.B.3	Oxydation des acides gras.....	18
1.1.C	Transport des acides gras	23

SECTION II- REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA FAS

1.2.A	Le gène de la FAS.....	25
1.2.B	Régulation nutritionnelle.....	27
1.2.B.1	Régulation par les hydrates de carbone.....	27
1.2.B.2	Régulation par les acides gras polyinsaturés...	29
1.2.B.3	Par les acides gras à chaîne moyenne.....	30
1.2.C	Régulation hormonale.....	31
1.2.C.1	Régulation par la triiodothyronine.....	32
1.2.C.2	Régulation par l'insuline.....	47

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES 57

2.1	Produits chimiques.....	58
2.2	Utilisation du modèle animal: le poulet.....	58
2.3	Préparation des hépatocytes et culture.....	59
2.4	Détermination de l'activité enzymatique.....	61
2.5	Dosage des protéines.....	62
2.6	Analyse du profil lipidique.....	63

2.7	Etudes de captation.....	64
2.8	Analyses statistiques.....	65
2.9	Considération éthique.....	65

CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	66
-----------------------	-----------

3.1	Impact des stimulations à L'insuline et à la T3 sur l'activité enzymatique de la FAS dans des hépatocytes d'embryon de poulet.....	67
3.2	Implication d'évènements de phosphorylation dans la régulation de la FAS.....	70
3.3	L'insuline a un effet majeur sur l'induction de l'activité de la FAS par la T3.....	74
3.4	L'inhibition des acides gras à chaîne moyenne requiert la présence simultanée de la T3 et l'insuline.....	76
3.5	Effet de l'hexanoate sur l'activité enzymatique lorsqu'il est ajouté au milieu réactionnel	77
3.6	Comparaison du potentiel inhibiteur de l'hexanoate et de l'octanoate.....	78
3.7	Impact de la captation sur l'inhibition des MCFAs.....	82
3.8	Le métabolisme intracellulaire des acides gras est requis pour l'inhibition	83
3.9	Effet des MCFAs sur les stimulations séquentielles...	87
3.10	Impact de la stimulation hormonale sur le métabolisme desMCFAs	88
3.11	Impact du type d'acide gras sur l'incorporation dans les différentes fractions lipidiques.....	93

CHAPITRE IV**DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 95**

4.1 Discussion..... 96

4.2 Conclusions..... 107

4.3 Perspectives..... 108

ANNEXES..... 110

Annexe A..... 111

Annexe B..... 112

BIBLIOGRAPHIE 113

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Principales étapes de la synthèse des acides gras au niveau hépatique.....	8
1.2 Biosynthèse du malonyl-CoA.....	9
1.3 Acide gras synthétase.....	12
1.4 Séquence des réactions catalysées par l'acide gras synthétase....	15
1.5 Vue d'ensemble de la synthèse des triacylglycérols et phospholipides.....	17
1.6 Rôle de la carnitine dans le transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale.....	20
1.7 β Oxydation des acides gras. ...	22
1.8 Structure des acides gras à chaîne moyenne.....	24
1.9 Mécanisme PPAR- dépendant et indépendant de régulation transcriptionnelle des gènes par les acides gras polyinsaturés.....	29
1.10 Voies de déiodination de l'hormone thyroïdienne.....	34
1.11 Types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne.....	36

1.12	Séquence et Arrangement des éléments de réponse à la T3.....	38
1.13	Structure cristalline du domaine de liaison du ligand du TR α -1.....	40
1.14	Modèle général de l'action de l'hormone thyroïdienne dans le noyau.....	41
1.15	Modèle moléculaire de répression basale en l'absence de T3 et d'activation en présence de la T3	45
1.16	Structure primaire de l'insuline.....	48
1.17	Effets de l'insuline sur la cellule.....	50
1.18	Voies de signalisation influencées par l'insuline et implication de l'insuline dans le métabolisme du glucose.....	53
1.19	Modèle de clivage protéolytique et d'action des "Sterol Regulatory Element Binding Protein".....	56
1.20	Médiateurs de l'effet de l'insuline sur le promoteur du gène FAS.....	56
3.1	Impact de la stimulation à l'insuline, à la T3 ou aux deux sur l'activité enzymatique de la FAS dans des hépatocytes d'embryon de Poulet.....	68
3.2	Impact de la stimulation séquentielle sur l'activité enzymatique enregistrée sur les CEH pendant une stimulation de 24 heures.....	70
3.3	Impact de la phosphorylation sur l'activité de la FAS.....	73

3.4	Stimulation T3 plus insuline en fonction du temps de stimulation et de la concentration d'insuline sur des CEH.....	75
3.5	Impact des acides gras à chaîne moyenne sur la stimulation hormonale de 24 heures	77
3.6	Impact de l'hexanoate sur l'activité enzymatique lorsqu'il est ajouté au milieu réactionnel.....	78
3.7	Comparaison du potentiel inhibiteur de l'hexanoate et de l'octanoate.....	80
3.8	Impact des acides gras à chaîne moyenne sur la Stimulation hormonale de 72 heures.....	81
3.9	Impact de la stimulation hormonale sur la captation de l'hexanoate dans les CEH.....	83
3.10	Impact de la bromo-hexanoate sur les activités enzymatiques de la FAS enregistrées dans les CEH	86
3.11	Activités enzymatiques FAS enregistrées en présence des métabolites.....	87
3.12	Stimulation séquentielle et inhibition par les acides gras.....	88
3.13	Profil lipidique obtenu dans les CEH stimulés pendant 24 heures en présence d'hexanoate.....	91
3.14	Impact de la variation de temps et la concentration d'insuline sur les inhibitions de l'activité de la FAS.....	92
3.15	Comparaison de l'incorporation relative de radioactivité dans les différentes fractions lipidiques entre l'hexanoate et l'octanoate.....	94

Annexe A	Effet de la concentration et de la longueur des chaînes des acides gras sur l'activité de l'enzyme malique dans des hépatocytes de poulet stimulés à la T3.....	111
Annexe B	Enzymes dont le degré de phosphorylation et l'activité sont altérés par l'insuline.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Structure chimique et activité biologique des hormones thyroïdiennes.....	33
1.2	Déroulement des effets de l'insuline	51

ABRÉVIATIONS

ACP	"Acyl carrier protein": Protéine transporteuse du groupement acyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AKT/PKB	Protéine kinase B. Le nom alternatif est AKT
AMP	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	5'-triphosphate d'adénosine ou adénosine triphosphate
bHLH-Zip	"helix-loop-helix leucine zipper"
BSA	Serum albumine bovine
CBP	"CREB binding protein"
CEH	Hépatocytes de poulet en culture
CO ₂	Dioxyde de carbone
CEBP	"CAAT enhancer binding protein"
Ci	Curie
CoA	Coenzyme A
Cpm	coup par minute
CR	Cétoacyl réductase
DBD	"DNA binding domain"
DIT	Diiodotyrosine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
D.O.	Densité optique
DRIPS	"vitamin D receptor interacting proteins"
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique

ER	Enoyl réductase
ERE	Elément de réponse aux Oestrogènes
FAT/CD36	Translocase d'acide gras ("fatty acid translocase"). Le nom alternatif est CD36
FAS	Acide gras synthétase (Fatty acid synthase)
GRE	Elément de réponse aux glucocorticoïdes
G3P	Glycérol 3-phosphate
GK	Glucokinase
HDAC1	déacétylase d'histone 1
HDL	Lipoprotéines à haute densité
H ₂ O	Eau
IDE	"insulin degrading enzyme". Il s'agit d'une insulinasé
IRS	"Insulin receptor substrate"
KPi	Potassium phosphate
KDa	Kilo Dalton
Kpb	Kilo paires de base
LBD	"Ligand binding domain"
LDL	Lipoprotéine à faible densité
LPL	Lipoprotéine lipase
MCFA	Acides gras à chaîne moyenne ("Medium chain fatty acid").
MKRBB	"Modified Krebs ringer bicarbonate buffer"
MTP	Protéine microsomale de transfert des triglycérides ("microsomal triglyceride transfer protein")
MIT	Monoiodotyrosine
mTOR	"mammalian target of rapamycin"
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite de la coenzyme)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)

OMS	Organisation mondiale de la santé
PUFA	Acides gras polyinsaturés "Polyunsaturated fatty acid"
PBS	"Phosphate buffered saline"
PI3-K	"Phosphatidylinositol 3-Kinase"
PPAR	"Peroxisome proliferator-activated receptors"
PPRE	"Peroxisome proliferator responsive element"
PUFA-BP	"PUFA binding protein"
PUFA-RE	"Polyunsaturated fatty acid response element"
RXR	récepteur à l'acide rétinoïque
S1P	serine protéase 1
S2P	serine protéase 2
SCAP	"SREBP cleavage activating protein"
SCD-1	"Stearyl-CoA desaturase" : désaturase des acides gras
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
SRE	"Sterol regulatory element"
SREBP-1	" Sterol regulatory element binding protein"
T3	3, 5,3'-l triiodothyronine (forme active de l'hormone thyroïdienne au niveau des tissus)
T4	3, 5,3',5'-l-tétraiodothyronine (forme circulante de l'hormone thyroïdienne)
TBG	"Thyroxine binding globuline"
TBPs	"Thyroid hormone binding proteins". Protéines liant les hormones thyroïdiennes en circulation.
TBPA	Préalbumine liant la thyroxine
TG	Triglycérides
TR	Récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne.
TRAPs	"Thyroid hormone receptor associated proteins"

TRE	Élément de réponse à l'hormone thyroïdienne. Région de l'ADN reconnu par le récepteur de l'hormone thyroïdienne.
T3-TR-T3RE	Complexe formé par la liaison de l'hormone T3, le récepteur à la T3 et l'élément de réponse à la T3
TSH	"Thyroid stimulating hormone"
U	Unité
USF	"upstream stimulatory factor"
UV	Ultra violet
VLDL	Lipoprotéines à très faible densité ("Very low density lipoprotein")

RÉSUMÉ

L'acide gras synthétase (FAS) est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* des lipides. Son inhibition représente donc une approche intéressante dans la réduction de la lipogenèse. En présence de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), cette enzyme synthétise la palmitate à partir de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA. Des facteurs hormonaux tels que l'insuline et la triiodothyronine (T3) et nutritionnels tels que les acides gras à chaîne moyenne (MCFAs) régulent l'activité de la FAS au niveau de la transcription. Toutefois, l'interaction entre ces facteurs est peu connue et mérite d'être explorée afin de comprendre la régulation de la FAS.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet des MCFAs, hexanoate ou octanoate (1mM), sur l'activité enzymatique de la FAS sur des hépatocytes de poulet de 19 jours stimulés à la T3 (1,6 μ M), à l'insuline (100 nM), et aux deux hormones sur une période de 24 heures. Deux inhibiteurs de protéine kinase, la H7 et la génistéine, ont également été utilisés pour déterminer l'impact de la phosphorylation sur la régulation de la FAS. L'activité enzymatique de la FAS a été déterminée dans ces différentes conditions de culture par mesure de la dégradation de NADPH à 340 nm par spectrophotométrie. La capacité des hépatocytes à capter les MCFAs ainsi que leur métabolisme intracellulaire ont également été évalués par des études de captation au C^{14} et de profil lipidique.

Individuellement, l'insuline et la T3 stimulent faiblement l'activité de la FAS. Un effet synergique important est observé lorsque les cellules sont stimulées simultanément aux deux hormones. L'incubation avec la H7 réduit fortement l'activité de la FAS indépendamment des conditions de stimulation tandis que la génistéine a un faible potentiel inhibiteur. Ensemble, ces résultats suggèrent une coopération entre l'insuline et la T3 ainsi que l'existence d'une voie de signalisation impliquant une serine/ thréonine kinase dans la régulation de la FAS. L'insuline est impliquée dans le métabolisme des MCFAs, toutefois, l'inhibition n'est observée qu'en présence de la T3.

Mots Clés : FAS, acides gras à chaîne moyenne, Insuline et triiodothyronine, phosphorylation, et estérification

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'augmentation récente de la prévalence de l'obésité dans la plupart des pays, tant industrialisés que dans les pays en voie de développement, ainsi que l'impact considérable de l'obésité sur la morbidité et la mortalité expliquent pourquoi l'obésité est considérée actuellement comme un problème essentiel de santé publique. Le rapport de l'OMS en 1998 indique que la prévalence de cette maladie a doublé au cours des deux dernières décennies dans pratiquement tous les pays avec un taux de croissance particulièrement élevé dans les pays où l'obésité était jusqu'alors presque inconnue (Rapport OMS, 1998). Plusieurs études montrent une corrélation entre l'obésité, les maladies cardio-vasculaires, les accidents cérébraux, le diabète, les lithiases biliaires et certains types de cancer (Wajchenberg, 2000 ; Kanel, 1985 ; Mann, 1974 ; Mc Garry et Dobbins, 1999). Des variations dans l'activité des voies de la lipogenèse peuvent avoir un impact sur l'incidence de conditions telles que l'athérosclérose, l'obésité et le diabète de type II (Mc Garry, 2002). Des hauts niveaux circulants de lipides sont associés au développement de l'athérosclérose (Wilson *et al.*, 1989). Chez les individus atteints de diabète de type II, en plus de l'hyperglycémie, on note des niveaux élevés d'acides gras libres et de triglycérides et des dépôts excessifs de graisse dans les tissus y compris le muscle et le foie. Cette exposition prolongée aux acides gras libres aurait des effets pro-apoptotiques sur les îlots du pancréas entraînant ainsi une diminution de la sécrétion d'insuline (Lupi *et al.*, 2002 ; Mc Garry et Dobbins, 1999). De plusieurs indices (indice de masse corporelle, ratio taille hanche ou gras corporel total) utilisés pour évaluer la résistance à l'insuline, l'accumulation de gras dans le muscle est l'indice qui corrèle le mieux (Krssak *et al.*, 1999 ; Perseghin *et al.*, 1999).

L'obésité est souvent perçue comme un problème cosmétique. Même si des études montrent qu'elle est aussi signe d'un dérèglement métabolique et lipidique en particulier (Mc Garry, 2002), la cause la plus importante demeure les habitudes de vie. Selon un schéma simplifié, l'obésité survient quand la consommation d'énergie est supérieure à la dépense. De fait la synthèse *de novo* des lipides contribue aussi de façon importante au développement de l'obésité (Ntambi, 1992 ; Ntambi, 1995, Waters et Ntambi, 1994 ; Miyazaki *et al.*, 2001), la synthèse se faisant majoritairement au niveau du foie chez l'humain et le poulet. Cette synthèse est régulée par la diète et les hormones. La FAS est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* des lipides. Les changements de son activité sont essentiellement dûs à des changements de la transcription du gène (Back *et al.*, 1986 ; Clarke *et al.*, 1990). La T3 augmente l'activité de la FAS en augmentant la transcription (Moustaid et Sul, 1991 ; Fisher et Goodridge, 1978). L'insuline aurait le même effet mais pourrait également agir au niveau post-transcriptionnel (Wilson *et al.*, 1986 ; stapleton *et al.*, 1990). De fait, l'effet de l'insuline est encore mal défini. L'activité enzymatique de la FAS, ainsi que son niveau d'ARNm sont fréquemment utilisés comme marqueurs de la synthèse lipidique *de novo* (Wang *et al.*, 2004). Aussi l'inhibition de la FAS est une approche intéressante dans la réduction de la lipogenèse.

Les acides gras contenus dans la diète inhibent l'activité de la FAS (Roncero et Goodridge, 1992). Tous ne l'inhibent cependant pas de la même façon dépendamment de la longueur ainsi que du degré de saturation de la chaîne. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne agissent en se liant à des éléments de réponse qui leur sont spécifiques sur les gènes lipogéniques (Naoya *et al.*, 1999). En ce qui concerne les acides gras à chaîne moyenne (MCFAs), des études orientent leurs effets vers une action au niveau du complexe T3-TR-T3RE (Thurmond *et al.*, 1998). Les MCFAs possèdent beaucoup de qualités digestives : absorption facile au niveau du tractus digestif, utilisation facilitée pour la cellule sans oublier leur arôme exquis (www.nysaes.cornell.edu/flavornet/smells.html.26k). De plus, on observe

chez les individus nourris avec une alimentation riche en MCFA, une perte de poids (Clarke *et al.*, 1990). Aussi, l'inhibition de la FAS par les MCFAs constitue du point de vue alimentaire une approche prometteuse pour réduire la production de gras.

Enfin, les MCFAs ont un effet inhibiteur réversible et sélectif pour les gènes lipogéniques (Roncero et Goodridge, 1992). Toutes ces caractéristiques leur confèrent un rôle physiologique important dans la régulation de la synthèse des lipides.

La prévalence de l'obésité et les bénéfices qu'on peut tirer d'une réduction de la lipogenèse par les MCFAs justifient une compréhension des mécanismes régulant la synthèse des acides gras. L'étude des mécanismes d'inhibition par les MCFAs serait aisée si on connaissait le(s) métabolite(s) impliqué(s). Il(s) est/sont toutefois inconnu(s).

Le but de notre étude est d'identifier le (s) métabolite (s) responsable (s) de l'inhibition de la transcription du gène FAS. Plusieurs raisons nous amènent à réaliser les expériences sur l'activité enzymatique :

- 1- La mesure de l'activité finale reflète la vraie réponse biologique.
- 2-On mesure une activité endogène et non une activité obtenue à la suite d'une transfection d'une région promotrice.
- 3-L'expérience est rapide comparativement à des mesures d'activités promotrices
- 4- Le coût est moindre.

CHAPITRE I :

ETAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I

ETAT DES CONNAISSANCES

SECTION I - Métabolisme des acides gras

1.1.A Synthèse hépatique des acides gras

Les acides gras sont essentiels au fonctionnement de la cellule. En plus de leur incorporation dans la membrane sous forme de phospholipides, ils sont essentiels pour le métabolisme cellulaire et la transduction des signaux par l'intermédiaire des hormones. Les hormones stéroïdiennes tels que l'œstrogène, la progestérone, la testostérone, l'aldostérone et le cortisol sont synthétisés à partir du cholestérol. Même si le cholestérol ne contient pas d'acides gras, son noyau stérol est formé à partir de dérivés d'acides gras : les acétyl-CoAs. La synthèse des lipides à longue chaîne est également essentielle pour la balance énergétique. Sous forme de triglycérides, les acides gras constituent une forme de stockage efficace.

1) Initiation de la synthèse des acides gras.

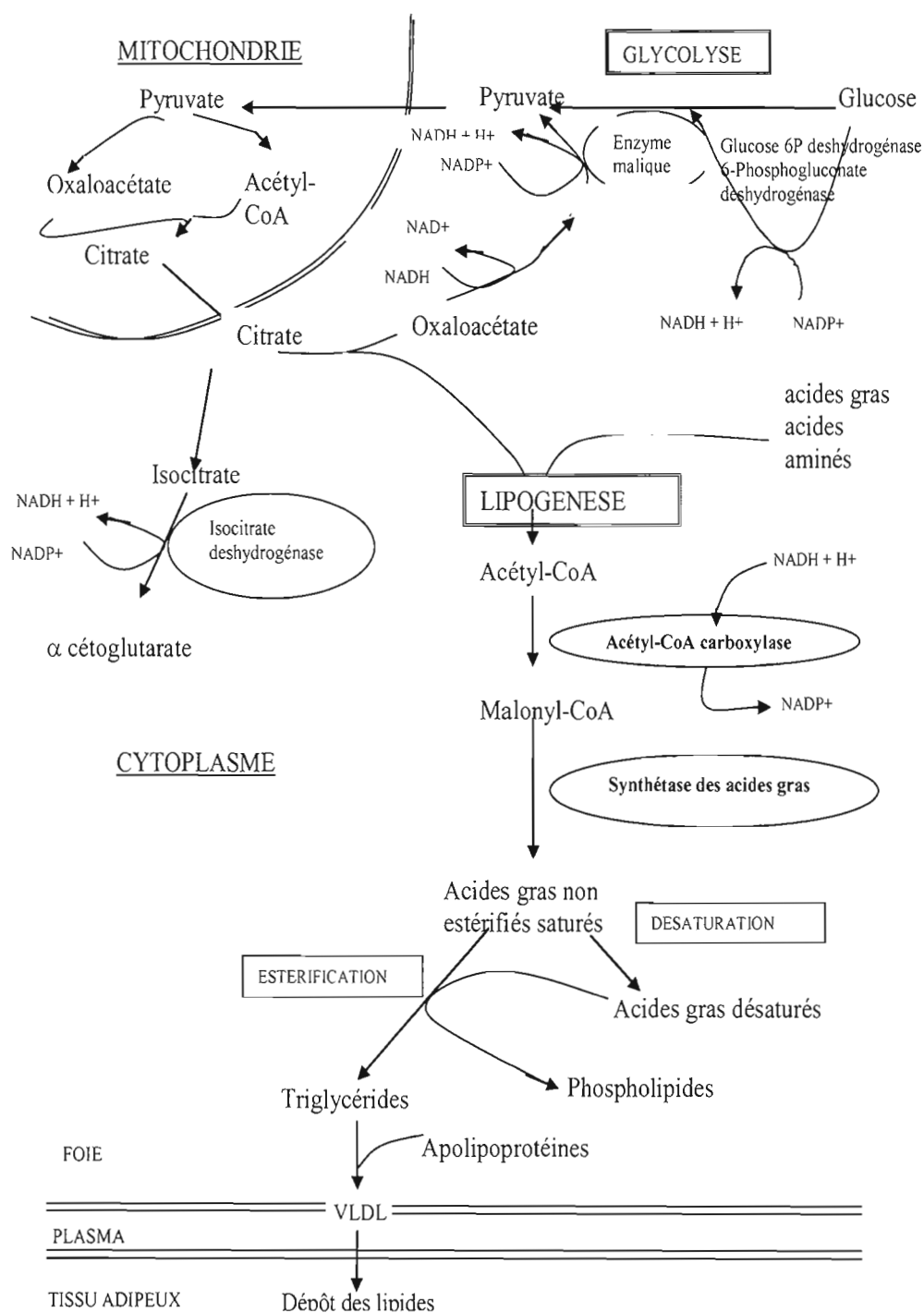
L'acétyl-CoA constitue le substrat majeur pour la synthèse des acides gras (Murray *et al.*, 1995 ; Zubay, 1983). Il est la source de tous les atomes de carbone des acides gras. Ce précurseur provient soit de la décarboxylation oxydative du pyruvate, soit de la dégradation oxydative de certains acides aminés ou encore de la β -oxydation des acides gras à longue chaîne (*figure 1.1*).

L'acétyl CoA carboxylase et la FAS assurent la conversion de l'acétyl CoA en palmitate. Ces réactions sont irréversibles. La synthèse des acides gras s'effectuant

dans le cytoplasme, l'acétyl CoA produit dans la mitochondrie est exporté dans le cytoplasme par le cycle de l'acide citrique. L'acétyl CoA et l'acide oxaloacétique sont convertis en acide citrique par le citrate synthase. Le citrate formé traverse la membrane mitochondriale par l'intermédiaire du système de transport tricarboxylate. L'acétyl CoA est régénéré dans le cytosol sous l'action de l'ATP citrate lyase.

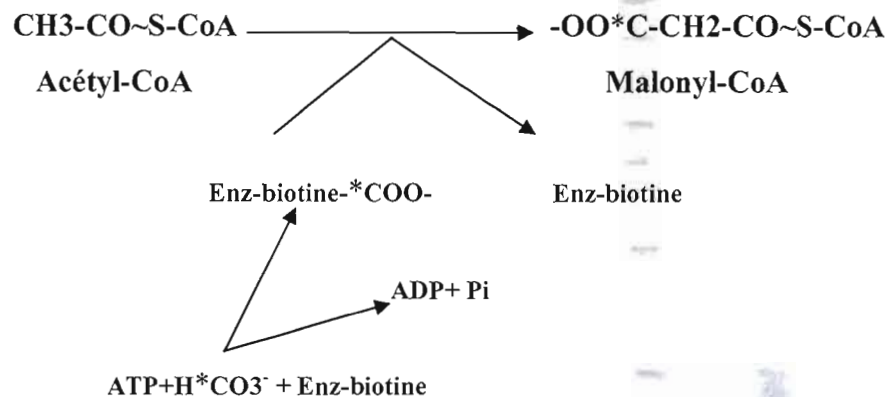
Figure 1.1 : Principales étapes de la synthèse des acides gras au niveau hépatique.

FAS = synthétase des acides gras ; G3P = glycérol 3-phosphate



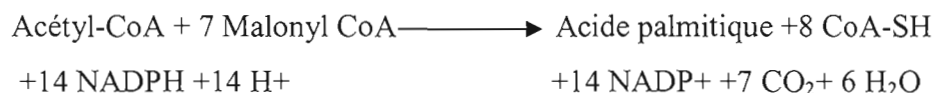
Dans la première étape de la synthèse des acides gras, l'acétyl CoA est carboxylé en malonyl CoA en présence d'ATP par l'acétyl CoA carboxylase. Pour cette réaction, la biotine est requise comme cofacteur (*figure 1.2*). La synthèse du malonyl-CoA se fait en deux étapes : en premier lieu, la biotine est carboxylée. L'ATP est nécessaire pour cette étape. Par la suite, le groupement carboxyle est transféré à l'acétyl-CoA pour former le malonyl-CoA.

Figure 1.2 : Biosynthèse du malonyl-CoA (Tirée de Murray *et al.* , 1995.)



Enz = acétyl-CoA carboxylase, * = groupement carboxyle

Dans la deuxième étape, le malonyl-CoA et l'acétyl CoA sont utilisés par la FAS pour la synthèse des acides gras. Elle catalyse la formation des acides gras tels que l'acide palmitique (C16 : O) et l'acide stéarique (C18 : O) selon l'équation suivante :



2) La protéine de l'acide gras synthase (FAS)

Contrairement aux bactéries et aux plantes où les réactions intervenant dans la synthèse des acides gras sont catalysées par des enzymes indépendantes, la synthèse des acides gras chez les vertébrés et les levures est réalisée par un complexe multi-enzymatique appelé FAS (Murray *et al.*, 1995). L'homologie en acides aminés entre l'oie et le poulet est de 88,5% (Holzer *et al.*, 1989) et est de 77,3% entre l'oie et le rat (Amy *et al.*, 1989) tandis qu'elle est de 81,3% entre l'oie et le poulet et 61,5% entre l'oie et le rat (Holzer *et al.*, 1989).

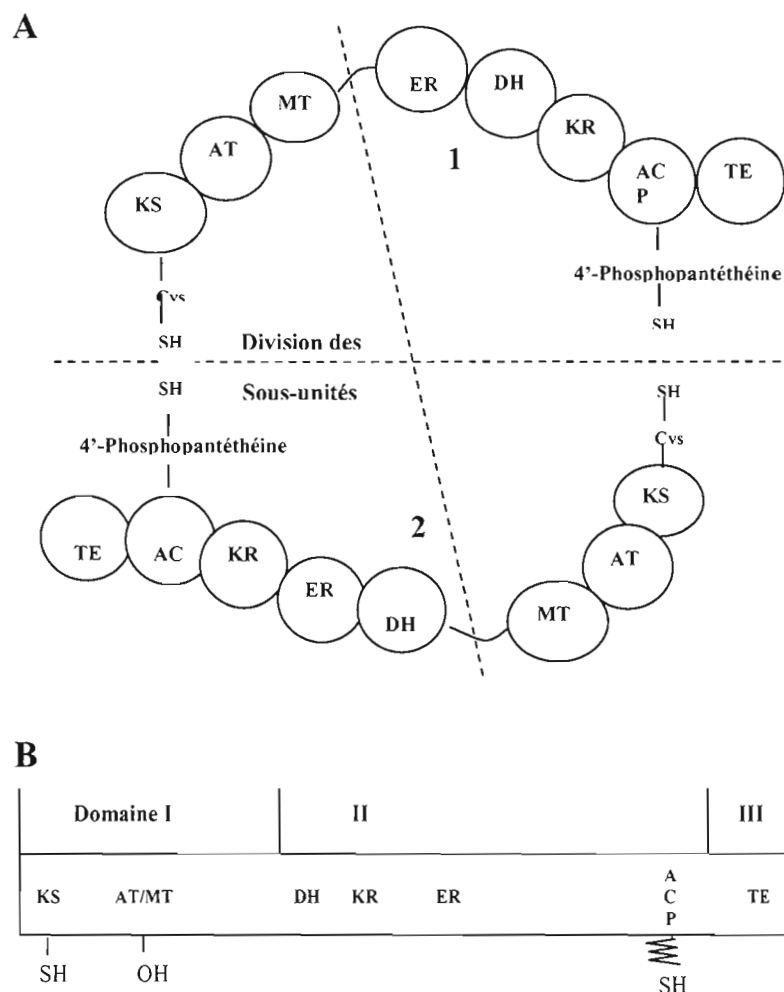
Cette enzyme a un poids moléculaire de 500 KDa. L'acide gras synthase est constitué de deux sous unités identiques de 250 KDa (Stoops *et al.*, 1975) liées par deux groupements thiol. Chaque sous-unité est constituée d'une chaîne polypeptidique contenant les sept activités enzymatiques de la FAS. Ainsi, sur chaque monomère, on retrouve les fonctions suivantes : une malonyl transacyclase, une acétyl transacyclase, une cétoacétyl synthase (enzyme condensante), une hydratase, une enoyl réductase, une cétoacyl reductase, une "acyl carrier protein" (ACP) et une thioestérase (*figure 1.3a*). La structure multifonctionnelle de cette enzyme présenterait de nombreux avantages car les intermédiaires de la synthèse sont directement transférés d'un site à l'autre et ne sont pas dilués dans le cytosol. De plus, dans un tel complexe, les modifications allostériques d'un site suite à la liaison

d'un substrat peuvent être communiquées à un autre site et affecter son activité. Ainsi Moore et ses collègues (2005) avaient noté que les activités de l'énoyl réductase (ER) et de la cétoacyl réductase (CR), des enzymes impliquées dans des réactions de réduction, nécessitaient deux molécules différentes de NADPH. Des substitutions d'acides aminés du site de liaison de l'ER entraînaient une réduction de l'activité catalytique du CR.

La région de 230 KDa, constituant le cœur de la protéine, a pu être séparée par protéolyse en deux domaines (Tsukamoto *et al.*, 1983) : le domaine I et le domaine II. Le domaine I (transacyclase) contient la β -cétoacyl synthase. Celle-ci correspond à la partie amino-terminale de la FAS. Toujours dans le domaine I, on trouve les sites actifs de l'acétyl-malonyl transacyclase (*figure 1.3b*).

Figure 1.3 : L'acide gras synthase

A, Complexe multienzymatique de l'acide gras synthase. (Tiré de Murray *et al.*, 1995.). **B, Localisation des sites fonctionnels de l'acide gras synthétase** (Tirée de Holzer *et al.*, 1989.)



TE : Thioestérase ; ACP : "Acyl carrier protein" ; ER : Enoylréductase ; KR : β cétoacyl réductase ; DH : β hydroxyacyl déshydratase ; AT/MT : acétyl/malonyl transacyclase et KS : β Cétoacyl synthase. Le complexe est un dimère formé de deux monomères identiques. Le -SH de la 4'-phosphopantéthéine d'un monomère est dans le voisinage du -SH de la cystéine de la cétoacyl synthase de l'autre monomère. Chaque monomère renferme toutes les activités partielles de la séquence des réactions, mais la véritable unité fonctionnelle est formée d'un demi-monomère réagissant avec la moitié complémentaire de l'autre.

Dans le domaine II (réductase), on retrouve les deux fonctions réductase de la FAS : l'énoyl réductase (ER) et la β -cétoacyl réductase (KR).

Le domaine ACP a été localisé dans la partie carboxy terminale du domaine II (Witowski *et al.*, 1987). Celui-ci sert de site d'attachement à l'acide gras nouvellement synthétisé pendant l'élongation. Il comporte un bras long et flexible, le fragment 4' phosphopantéthéine sur lequel est fixé l'acide gras. La thioestérase, une protéine de 33 KDa a été localisée dans le domaine III (Holzer *et al.*, 1989).

Seule la forme dimérique est active. La dissociation de l'enzyme en monomères conduit à l'inactivation enzymatique de la FAS (Stoops *et al.*, 1975 ; Lornitzo *et al.*, 1975). Cependant, sous forme monomérique, seule l'activité de la β -cétoacyl synthase est perdue alors que les autres activités sont conservées (Butterworth *et al.*, 1967). En fait, l'activité de la FAS dépend de l'association étroite des groupements thiol de la β -cétoacyl synthase et du domaine ACP portés par l'une et l'autre des sous unités (Stoops et Wakil, 1981). Afin de minimiser la dissociation du dimère et pouvoir mesurer l'activité, la lyse cellulaire est réalisée dans du tampon phosphate (Stoops *et al.*, 1975).

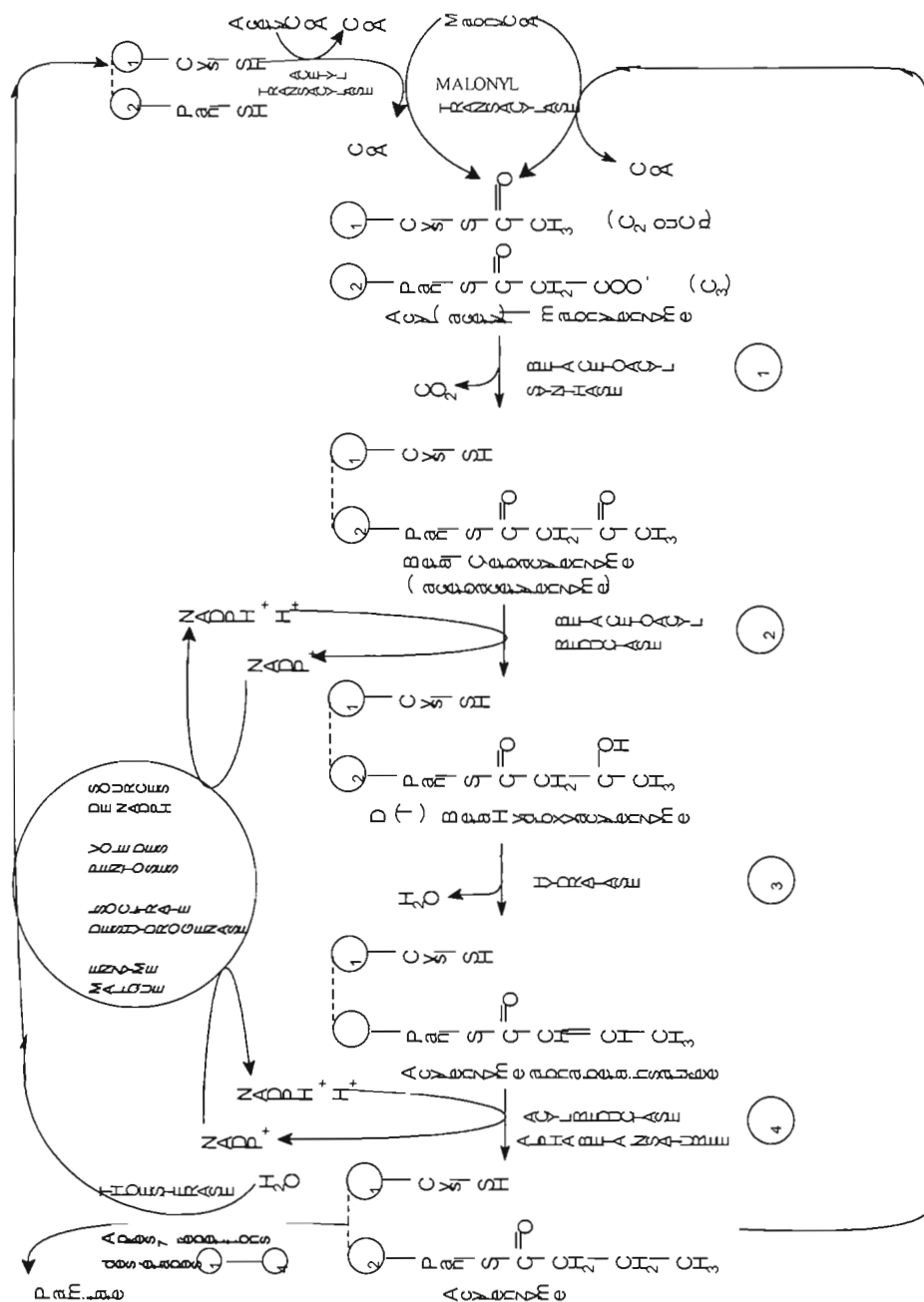
3) Réactions catalysées par la FAS :

Le modèle décrit ici est celui de la levure, car il est le mieux étudié. Du fait de la similitude structurale des sites de liaison de la FAS entre les levures et les oiseaux, ce modèle pourrait être appliqué à celui des eucaryotes (Stoops *et al.*, 1990). Chez les oiseaux, la synthèse des acides gras débute avec l'acétyl-CoA et le malonyl CoA tandis que, chez les bovins et les rongeurs, le butyryl CoA, l'acétoacétyl CoA et le crotonyl CoA peuvent être également utilisés comme substrat (Wakil *et al.*, 1983).

Le NADPH est nécessaire pour cette réaction. Ce cofacteur est synthétisé dans le cytoplasme et est généré lors de la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate par l'enzyme malique (*figure 1.1*).

La synthèse débute par le transfert de l'acétyl CoA et du malonyl CoA à la FAS. Une molécule d'acétyl CoA se lie au groupement –SH de la cystéine. Cette réaction est catalysée par une acétyl transacyclase. Le malonyl CoA réagit avec le –SH adjacent sur la 4'-phosphopantéthéine de l'ACP de l'autre monomère pour former l'acétyl-(acyl)-malonyl enzyme. Cette réaction est catalysée par la malonyl transacyclase. Le groupement acétyle lié à la sérine-OH est transféré au groupement thiol de la cystéine de la β -cétoacyl synthase. Le radical acétyl interagit avec le groupement méthylène du résidu malonyl sous l'action de la 3-cétoacyl synthase formant la 3-cétoacyl enzyme en libérant du CO₂. Durant cette réaction, le groupement –SH de la cystéine occupé jusque-là par l'acétyle est libéré. Le groupe 3-cétoacyle est réduit, déshydraté et réduit une seconde fois pour former l'acyl-S-enzyme saturée. Une nouvelle molécule de malonyl CoA se fixe à la 4'-phosphopantéthéine, déplaçant le résidu acyl saturé sur le groupement –SH libre de la cystéine. La séquence des réactions est répétée six fois, avec à chaque fois, incorporation d'un nouveau résidu malonyl jusqu'à l'obtention de palmitoyl (*figure 1.4*). Ce dernier est libéré de la FAS par hydrolyse par la thioestérase. L'enzyme a une forte affinité pour le palmitoyl CoA. En l'absence de la thioestérase, l'élongation de la chaîne d'acide gras peut se poursuivre (Wakil *et al.*, 1983).

Figure 1.4 : Séquence des réactions catalysées par l'acide gras synthétase. (Tirée de Murray *et al.*, 1995.)



Cys : résidu cystéine ; Pan : 4'-phosphopantéthéine

1.1.B Transformation des acides gras

Une fois l'acide gras synthétisé, il peut être, soit estérifié, soit désaturé.

1) Désaturation

L'acide palmitique et l'acide stéarique sont des acides gras saturés produits par la FAS. Leur désaturation, par introduction de doubles liaisons, produit respectivement l'acide palmitoléique (C16:1) et l'acide oléique (C18:1). La première double liaison introduite dans un acide gras saturé est presque toujours en position $\Delta 9$. Dans le réticulum endoplasmique, la $\Delta 9$ désaturase ou stéaryl-CoA désaturase, avec la NADH-cytochrome b5 réductase et le cytochrome b5, catalyse la conversion du palmitol-CoA en palmitoléyl-CoA ou du stéaroyl-CoA en oléyl-CoA. L'oxygène et le NADH ou NADPH sont nécessaires à la réaction.

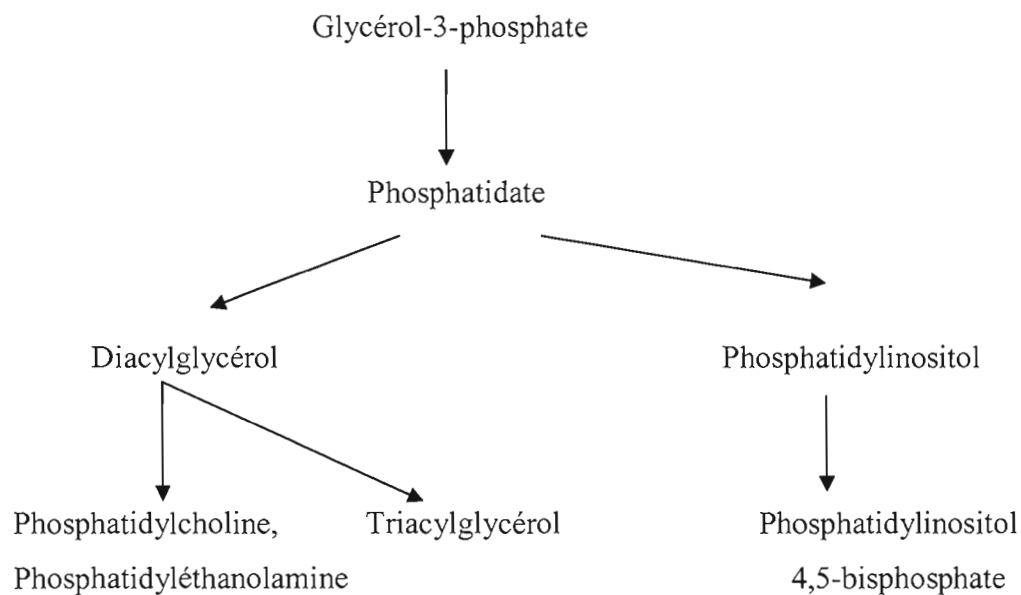
2) Estérification des acides gras

Les triglycérides constituent la forme de stockage d'énergie dans l'organisme (David Plummer, 1989). Une fois l'acide gras synthétisé, il peut être estérifié. L'estérification dépend de la présence du glycérol-3-phosphate dans la cellule hépatique (Murray *et al.*, 1995).

Le palmitate libre est d'abord activé en acyl-CoA par l'acyl CoA synthase en présence d'ATP et de coenzyme A pour former un dérivé acyl-CoA. Deux molécules d'acyl-CoA réagissent avec une molécule de glycérol 3- phosphate pour former une molécule de phosphatidate (1-2 diacylglycérol phosphate) (*figure 1.5*). Deux enzymes interviennent dans la synthèse de phosphatidate. La première est la glycérol-3-phosphate acyl transférase et la seconde est la 1-acylglycérol-3-phosphate acyl-transférase. Le phosphatidate est transformé par la phosphatidate phosphohydrolase en 1-2diacylglycérol. Une autre molécule est estérifiée avec le diacylglycérol pour former le triacylglycérol. Cette réaction est catalysée par la

diacylglycérol acyl-transférase. Le phosphatidate et le 1-2 diacylglycérol sont également utilisés comme précurseurs pour la synthèse des phospholipides.

Figure 1.5: Vue d'ensemble de la synthèse des triacylglycérols et phospholipides.
(Tirée de Murray *et al.*, 1995.)



Après estérification et désaturation, les lipides sont exportés vers d'autres tissus pour y être stockés ou utilisés. Puisque les lipides sont insolubles dans l'eau et doivent pourtant être transportés dans le plasma, dans le foie, ils sont associés à des apoprotéines pour former des lipoprotéines qui sont solubles dans l'eau.

L'apoprotéine B-100 est essentielle pour la formation des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Ceux-ci assurent le transport des triglycérides formés dans le foie (**figure 1.1**). Les VLDL sont également riches en esters de cholestérol. Dans chaque VLDL, il y a seulement une molécule d'apo B. Ce polypeptide de 4536 acides aminés

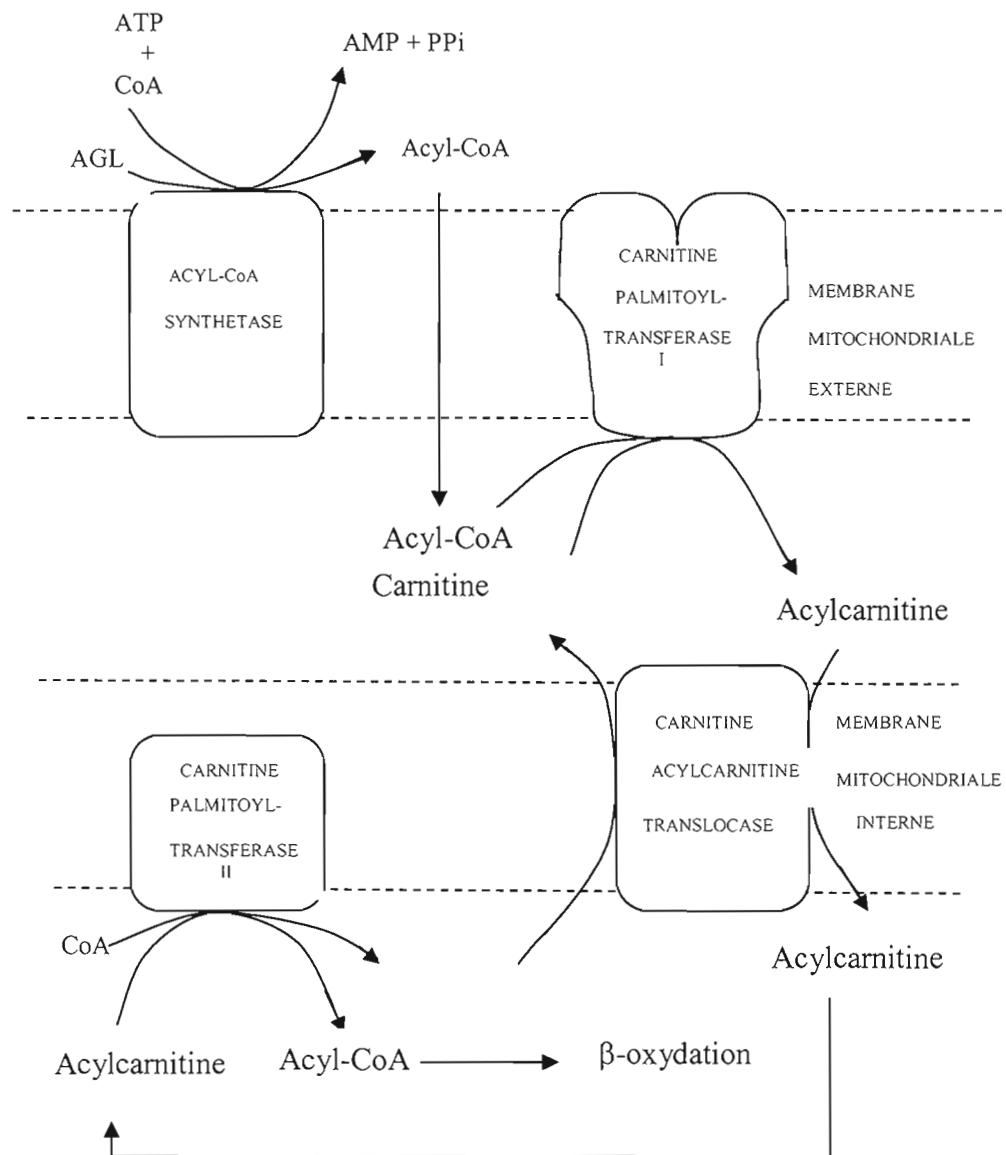
est en majorité synthétisé par le foie et a un poids moléculaire de 550 KDa. Le VLDL est considéré comme une lipoprotéine athérogénique majeure (Dixon et Ginsberg, 1993 ; Shizuko *et al.*, 2005). Pendant la formation des VLDL, la MTP "microsomal triglyceride transfer protein" catalyse le transfert des lipides (TG, esters de cholestérol, phospholipides) vers les molécules d'Apo B. La présence de cette protéine constitue l'étape limitante pour l'assemblage des VLDL (Dixon et Ginsberg, 1993 ; Shizuko *et al.*, 2005). Les acides gras transportés par les VLDL sont acheminés vers le tissu adipeux. Ils sont captés par la cellule adipeuse, mais aussi par les autres cellules, après hydrolyse par la lipoprotéine lipase (LPL). Dans le tissu adipeux, les acides captés sont réestérifiés et stockés.

3) L'oxydation des acides gras

L'oxydation accrue des acides gras est caractéristique du jeûne. On retrouve cet état aussi dans le diabète ou après ablation du pancréas. Cet effet serait dû à l'absence d'insuline. La lipase hormono sensible présente dans les adipocytes étant activée, il y a hydrolyse des triglycérides stockés. Cela a pour effet d'augmenter les acides gras libres circulant qui deviennent la principale source d'énergie (Guyton et Hall, 2000). Les principaux acides gras libres présents dans le plasma sont les acides gras à longue chaîne qu'on trouve dans le tissu adipeux tels que les acides palmitique, stéarique, oléique, palmitoléique, linoléique, et d'autres acides tels que les acides gras polyinsaturés. A leur entrée dans le cytosol, les acides gras sont activés en présence d'ATP par la thiokinase (Acyl-CoA synthase) en un dérivé acyl-CoA. Ce dernier peut être estérifié ou oxydé par la cellule. L'oxydation des acides gras a lieu principalement dans la mitochondrie (Papamandjaris *et al.*, 1998). Il s'agit de la β -oxydation.

Les acyl-CoA formés ne peuvent traverser la membrane mitochondriale que sous forme de dérivés de la carnitine (Acyl-carnitine) (*figure 1.6*). Cette étape de transformation se produit à la surface externe de la mitochondrie grâce à la carnitine palmitoyl-transférase I. Ensuite, la carnitine-acylcarnitine translocase assure le transport de l'acylcarnitine dans la mitochondrie. L'acyl-CoA est reformé dans la matrice mitochondriale par la palmitoyltransférase II (Bach et Babayan, 1982).

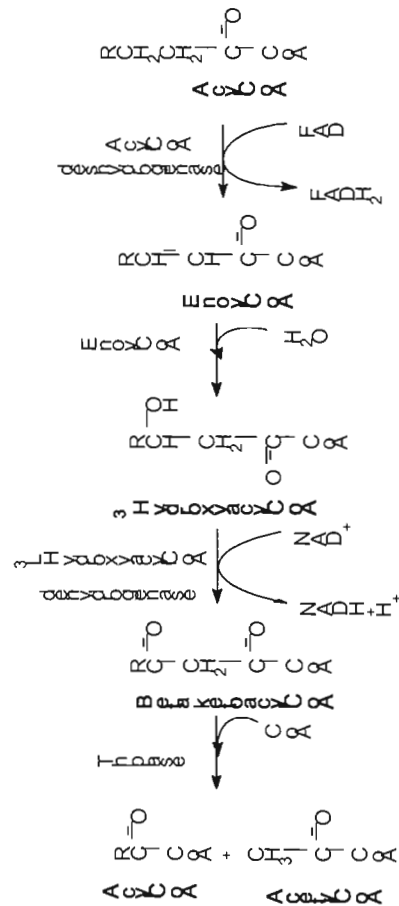
Figure 1.6: Rôle de la carnitine dans le transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale. (Tirée de Murray *et al.*, 1995.)



L'oxydation des acides gras à chaîne courte et moyenne peut se faire indépendamment de la carnitine (Friedman *et al.*, 1990).

A l'intérieur de la mitochondrie, les acyl-CoA sont β -oxydés avec libération d'acétyl-CoA et d'une molécule d'acyl-CoA (**figure 1.7**). La molécule d'acétyl-CoA peut alors être utilisée par la cellule. Il est à noter que l'oxydation des acides gras donne de l'acétyl CoA et que leur biosynthèse s'effectue à partir du même composé. Cependant, bien que le matériel de départ soit identique au produit de l'oxydation, les deux réactions ne sont pas l'inverse l'une de l'autre. Les deux voies sont différentes et s'effectuent dans différents compartiments cellulaires. L'oxydation des acides gras s'effectue dans la mitochondrie tandis que la synthèse s'effectue dans le cytoplasme. Toutes les étapes de l'oxydation comportent des dérivés acyl-CoA.

Figure 1.7 : β Oxydation des acides gras. (Tirée de Zubay, 1983.)



L'acyl-CoA formé peut aller à travers un autre cycle d'oxydation avec à chaque fois libération d'un acétyl-CoA et formation d'un acyl-CoA plus court de deux atomes de carbone. Le cycle se reproduit jusqu'à obtention de deux molécules d'acétyl-CoA.

1.1.C Transport des acides gras

Dans le milieu extracellulaire, la liaison des acides gras à longue chaîne à l'albumine les solubilise de façon efficace. Aussi la complexification des acides gras à l'albumine les rend plus solubles dans le milieu. Après la dissociation du complexe acide gras-albumine, les acides gras se fixent à une protéine membranaire assurant leur transport à travers la membrane (Hirsch *et al.*, 1998 ; Stahl *et al.*, 2002).

Le transport des acides gras à longue chaîne fait intervenir des protéines de transport. La sensibilité des études de capture aux agents modifiant les protéines de transport est un argument en faveur du transport facilité (Abumrad *et al.*, 1998). Plusieurs protéines ont été identifiées comme protéines de transport à travers la membrane plasmique. Par exemple, la protéine FAT/CD36, une protéine de 88 kDa que l'on retrouve sur les tissus ayant un taux élevé d'utilisation des acides gras tels que le tissu adipeux, le muscle, le cœur, le foie et les intestins est absente du cerveau qui n'utilise pas d'acide gras exogène (Abumrad *et al.*, 1993). Son niveau d'expression peut être modulé par l'état nutritionnel ou influencé par des conditions métaboliques.

SR-BI est un récepteur pouvant interagir avec les lipides et pourraient moduler l'environnement lipidique de la cellule à travers un processus de transport selectif (Rhainds et Brissette, 2004). Chez le rat, la souris et l'humain, ce récepteur de 82 kDa est exprimé dans les tissus ayant un rôle important dans le métabolisme du cholestérol dans les organes tels que les surrénales, les ovaires et le foie. Il y a très peu d'expression au niveau des testicules, le cœur, la glande mammaire, les intestins. Aucune expression n'est notée au niveau du placenta, les reins, le cerveau, les poumons, les muscles, l'utérus et la rate (Landschulz *et al.*, 1996 ; Acton *et al.*, 1996 ; Cao *et al.*, 1997). Ce récepteur est très impliqué dans la capture des esters de cholestérol présent dans les lipoprotéines à haute densité (HDL) et les lipoprotéines à faible densité (LDL) et l'efflux du cholestérol hors de la cellule (Rhainds et Brissette, 2004). L'implication de ce récepteur dans le transport des acides gras à chaîne moyenne reste à être élucidé.

Dans la cellule, les acides gras à longue chaîne sont liés à la protéine Z, à une protéine liant les acides gras (Murray *et al.*, 1995).

Les acides gras à chaîne plus courte sont plus *hydrosolubles* et ils sont sous forme d'un acide non ionisé ou d'un anion d'acide gras dans le plasma (Murray *et al.*, 1995). Leur transport à travers la membrane plasmique semble dépendant d'une simple diffusion. Cet argument est favorisé du fait de leur courte taille, soit 6 à 8 atomes de carbone (*figure 1.8*).



Figure 1.8 : Structure des acides gras à chaîne moyenne (ici l'octanoate). En gris, les atomes de carbone ; en blanc les atomes d'hydrogène et en rouge les atomes d'oxygène.

SECTION II - Régulation de l'activité de la FAS

L'activité de la FAS est régulée par des facteurs hormonaux et nutritionnels. Son activité est majoritairement influencée par des modifications de la concentration en enzyme. Sa concentration augmente chez un sujet nourri et diminue dans un état de jeûne. On peut donc dire que la FAS est une enzyme adaptative. Aucune modification allostérique n'a été rapportée pour la FAS (Hillgartner *et al.*, 1995). La régulation de la FAS se fait donc essentiellement au niveau de la transcription (Moustaid et Sul, 1991 ; Fischer et Goodridge, 1978 ; Wilson *et al.*, 1986, Stapleton *et al.*, 1990).

1.2.A Le gène de la FAS

La taille du gène de la FAS de l'oie est de 50 Kpb (Kameda et Goodridge, 1991). Celui du rat est de 20 Kpb (Amy *et al.*, 1992).

Le gène de la FAS de rat compte 43 exons dont 42 sont codants. Chaque domaine catalytique de l'enzyme est codé par des exons spécifiques. Les exons 2 à 8 codent pour le domaine β -cétosynthase. Les exons 9 à 15 codent pour l'acétyl/malonyl transacyclase (Beck *et al.*, 1992 ; Amy *et al.*, 1992). Les exons 16 à 21 codent pour le domaine β -hydroxyacyl déshydratase. Les exons 29 à 32 codent pour l'énolyl réductase, les exons 33 à 37 pour le domaine β -cétoréductase, l'exon 38 pour l'ACP et les exons 39 à 43 pour la thioestérase.

Seuls les premiers exons ont été caractérisés chez l'oie. La comparaison des gènes de rat et d'oie révèle que l'organisation de ces deux gènes est fortement similaire (Kameda et Goodridge, 1991 ; Amy *et al.*, 1992).

La région 5' flanquante du gène de la FAS de rat s'étend sur 5 kpb (Beck *et al.*, 1992) et celle de l'oie sur 4 kpb (Kameda et Goodridge, 1991). Dans le promoteur, seule une région de 110 pb avoisinant les sites d'initiation de la transcription du gène de l'oie et du gène de rat est homologue. Cette partie contient des séquences consensus TATA et CAAT identiques chez les deux espèces. L'expression du gène de la FAS est régulée par les hormones et les nutriments. Les éléments nécessaires à cette régulation sont contenus dans les premiers 2,1Kpb du promoteur (Wang *et al.*, 2004). Sur le gène du rat, on a identifié la présence d'éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), aux oestrogènes (ERE), à la triiodothyronine (TRE) (Beck *et al.*, 1992 ; Amy *et al.*, 1990). Dans celui de l'oie, la présence de TRE, GRE et C/EBP ("CAAT enhancer binding protein") a également été observée (Kameda et Goodridge, 1991).

Une analyse informatique a été également réalisée au laboratoire sur le même promoteur. Celle-ci montre une forte analogie qu'avec celle réalisée par Kameda et Goodridge dont 100% en position -91 et -106. Les études de transfection avec un fragment du promoteur de 1450 pb dans des cellules HepG2 ont permis d'identifier une autre région répondant à la T3 allant de -765 à -663 (**Mémoire Caroline Martel, 2005**). L'alignement des séquences avec ceux tirés de l'article de Wang et collaborateurs (2004) montre que cette région est fortement conservée entre le poulet et l'oie. Ce qui indique une action directe de la T3 sur le gène de la FAS.

L'ARNm de la FAS est détectée en quantité abondante dans le foie chez le poulet, le foie et le tissu adipeux chez les rongeurs (Shillabeer *et al.*, 1990), et chez le porc (Mildner et Clarke, 1990). De plus, il a été aussi détecté dans les glandes mammaires de rates en lactation (Schweiser *et al.*, 1989, Amy *et al.*, 1990). Les ARNm de la FAS sont également mis en évidence, en faible quantité, dans l'intestin, le muscle, les reins, le poumon et le cœur (Paulauskis et Sul, 1988). Cependant la modulation nutritionnelle ou hormonale de la quantité d'ARNm n'est observée qu'au niveau hépatique (Laux et Schweizer, 1990 ; Clarke, 1993). Cette modulation spécifique au

foie peut être exploitée pour l'inhibition de la synthèse *de novo* sans atteinte au niveau d'autres tissus où elle peut être critique tel que la synthèse de surfactant au niveau des poumons.

1.2.B Régulation nutritionnelle

1) Régulation par les hydrates de carbone

L'activité de la FAS augmente chez un sujet nourri et diminue chez un sujet en état de jeûne. Le glucose augmente la transcription des gènes impliqués dans les voies lipogéniques dont l'enzyme malique (Katsurada *et al.*, 1990) et la FAS (Katsurada *et al.*, 1990). Cependant, l'induction par le glucose requiert la présence de l'insuline. Dans leurs expériences, Hillgartner et Charron (1998) n'observent pas de fortes activités enzymatiques dans des hépatocytes incubés en présence de glucose seul. Il n'y a pas non plus d'augmentation d'activité en présence d'insuline à 50 nM. En présence de T3, il y a une forte induction. Les effets du glucose sont localisés surtout au niveau de la transcription (Hillgartner et Charron, 1998). Toutefois, le glucose devait être phosphorylé en glucose 6-phosphate par la glucokinase (GK) pour avoir un effet inducteur (Foufelle *et al.*, 1996). L'expression du gène de la GK est dépendante de l'insuline.

Des séquences nommées choRE (carbohydrate response element) ont été identifiées sur le promoteur du gène de la FAS. Elles consistent en deux motifs -CACGTG - GGCGTG de "type E-box" séparés par 5 pb et il existe aussi des sites indépendants pour l'action de l'insuline (Rufo *et al.*, 2001; Magana *et al.*, 2000). Ces deux sites agissent en synergie pour moduler l'effet de l'insuline. Les ChREBP "carbohydrate responsive element binding protein" reconnaissent la séquence E box. En l'absence de glucose, la ChREBP est localisée dans le cytosol de la cellule. Sa translocation vers le noyau est induite suite à l'entrée de glucose dans la cellule, entraînant des

événements de déphosphorylation de la protéine. La protéine phosphatase 2A (PP2A) qui est responsable de la déphosphorylation serait activée par la Xylulose 5-phosphate (X5P), un métabolite généré par la voie glycolytique en présence de glucose (Doiron *et al.*, 1996).

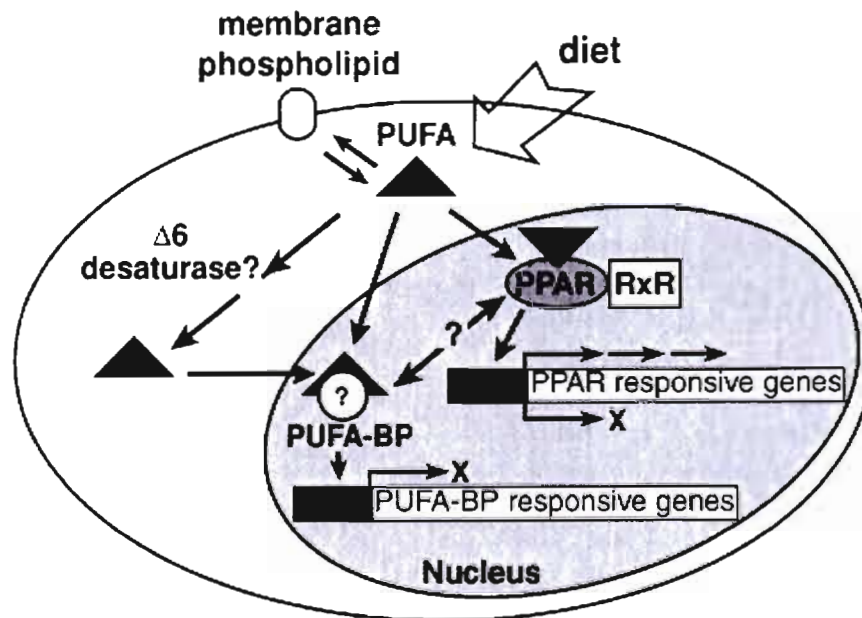
2) Régulation de la lipogénèse par les acides gras polyinsaturés

Les acides gras contenus dans la diète ont un rôle inhibiteur sur la lipogénèse, leur effet étant majoritairement au niveau de la transcription.

Les acides gras polyinsaturés (PUFA) réduisent l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et des hydrates de carbone (Blake et Clarke, 1991 ; Toussant *et al.*, 1981). Ainsi, l'expression de l'acétyl CoA carboxylase, de l'enzyme malique, de la FAS, de la pyruvate kinase et de la SCD-1 est diminuée de 60-90% par des diètes riches en PUFA (Clarke et Jump, 1994), les plus étudiés étant ceux de la famille des n-3 et n-6. Deux mécanismes sont proposés pour l'action des PUFA : une régulation dépendante des PPARs (*Peroxisome proliferator-activated receptors*) et une régulation indépendante des PPARs (Sessler et Ntambi, 1998).

Dans la régulation PPAR-dépendante, les PUFA se lient aux PPAR/RXR assemblés en hétérodimères empêchant ainsi la transactivation du récepteur. Ces récepteurs se lient à une région de l'ADN appelés PPRE (*Peroxisome proliferator responsive element*) pour moduler (inhiber ou stimuler) l'expression des gènes cibles. Dans la régulation PPAR-indépendante, les PUFA se lient à la protéine PUFA-BP ("PUFA binding protein"). C'est ce complexe qui, en se liant au PUFA-RE ("Polyunsaturated fatty acid response element"), inhiberait exclusivement l'expression des gènes cibles (*figure 1.9*).

Figure 1.9 : Mécanisme PPAR-dépendant et indépendant de régulation transcriptionnelle des gènes par les acides gras polyinsaturés. (Tirée de Sessler et Ntambi, 1998.)



PUFA : Acides gras polyinsaturés ; RXR : Récepteur à l'acide rétinoïque, PPRE : élément de réponse de prolifération du peroxisome ; PUFA-RE : Elément de réponse aux PUFAs.

3) Régulation de la lipogénèse par les acides gras à chaîne moyenne

Les acides gras à chaîne moyenne (MCFA) ont un rôle physiologique. Ils sont des inhibiteurs de la lipogénèse (Roncero et Goodridge, 1992; Thurmond *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2003, Limatta *et al.*, 1994). Des études, faites par l'équipe de A. Goodridge, ont démontré qu'en présence d'acides gras à chaîne moyenne que sont l'hexanoate et l'octanoate, l'augmentation de la transcription de l'enzyme malique et de la FAS induite par la T3 était moins importante (Roncero et Goodridge, 1992 ; Thurmond *et al.*, 1998).

Leur inhibition se situe au niveau de la transcription. L'inhibition par les MCFAs est sélective, car leur inhibition n'affecte pas la transcription des gènes de la glycéraldéhyde-3-phosphate ou de la β -actine (Thurmond *et al.*, 1998). Elle est aussi spécifique. En effet, les acides gras contenant 4 ou 10 atomes de carbone et certains acides gras modifiés n'ont pas d'effet (Roncero et Goodridge, 1992). Le mécanisme d'inhibition n'est cependant pas connu. Les résultats des expériences menées par l'équipe de A. Goodridge (Thurmond *et al.*, 1998) suggèrent que l'inhibition se situerait au niveau du complexe T3-TR-TRE. Les MCFAs inhibent la fonction transactivatrice du récepteur à l'hormone thyroïdienne mais n'affectent pas sa fonction de répresseur de la transcription du gène. De plus ils n'affectent pas la liaison de la T3 au récepteur. L'activité transcriptionnelle induite par l'interaction de la T3 avec son élément de réponse est abolie par un traitement aux MCFAs. Aucune inhibition n'est observée pour la réponse aux glucocorticoïdes et à l'AMP cyclique. L'inhibition de la transactivation est donc spécifique. Il se pourrait que l'hexanoate ait une influence sur un facteur interagissant avec les récepteurs à la T3. La séquence N-terminale du récepteur est requise pour l'inhibition (Thurmond *et al.*, 1998). Dans les études effectuées par Roncero et Goodridge (1992), l'hexanoate était en mesure d'inhiber l'activité enzymatique 30 minutes après son addition au milieu.

L'hexanoate régulerait donc l'initiation de la transcription par l'intermédiaire de mécanismes très rapides. Cependant, les MCFAs n'avaient pas d'effet sur le gène de la β -actine. Deux heures après qu'on ait retiré l'hexanoate du milieu, le taux de transcription revient au même niveau que dans les cellules non traitées avec MCFAs. Ces expériences indiquent que l'hexanoate et l'octanoate ont une inhibition sélective et forte mais réversible sur la transcription des gènes de la FAS (Roncero et Goodridge, 1992).

Le métabolite actif des MCFAs est inconnu. Ce dernier pourrait être un MCFA non modifié ou un métabolite dérivé des MCFAs. Il est peu probable que le MCFA soit lui-même le médiateur de l'inhibition car les concentrations plasmiqes inhibant l'activité des enzymes lipogéniques sont rarement atteintes (Thurmond *et al.*, 1998). La caractérisation de cette inhibition constitue le but de mon étude.

1.2.C Régulation hormonale

La régulation de la concentration de plusieurs enzymes lipogéniques par les hormones se fait aussi au niveau de la transcription. Au départ, cette régulation coordonnée favorisait l'hypothèse d'un mécanisme identique de régulation. Mais il est de plus en plus évident qu'il existe différents mécanismes de régulation. Par exemple, la T3 stimule la transcription des gènes de la FAS et de l'enzyme malique, mais n'a pas d'effet sur la transcription du gène de la pyruvate kinase (Holzer *et al.*, 1989 ; Vaulont *et al.*, 1986) et aurait un effet négatif sur la stéaryl CoA désaturase (Yen *et al.*, 2003). L'équipe de Ntambi avait noté qu'une injection de 15 μ g de T3 à des rats hypothyroïdiens entraînait une diminution de la quantité d'ARNm de SCD1 de 50% en 48h et 65% en 6 jours. Dans leurs études, une région de réponse à la T3 avait été localisée et les expériences de retard sur gel confirmaient la liaison du récepteur. Il y aurait donc, dans le promoteur du gène SCD1, un élément de réponse négatif à la T3 (Waters *et al.*, 1997).

Ainsi pour un même type de liaison, la régulation transcriptionnelle des genes peut être différente. Cela peut s'expliquer par le rôle différent de ces enzymes dans le métabolisme de la cellule. Le pyruvate kinase par exemple régule la synthèse des acides gras et la glycolyse tandis que la FAS est uniquement impliquée dans la synthèse des acides gras.

1) Régulation par la triiodothyronine

a- Synthèse des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes contrôlent l'expression génétique, la différenciation cellulaire et le développement général. Elles jouent également un rôle important dans le métabolisme. Les cellules folliculaires de la glande thyroïde produisent deux hormones : la 3,5,3' triiodothyronine (T3) et la 3,5,3'5'-tétraiodothyronine (T4, thyroxine) à partir d'une molécule précurseur, la thyroglobuline. Par iodination des résidus tyrosine présents sur la thyroglobuline, sont formés des moniodotyrosine (MIT) ou des diiodotyrosines (DIT). Celles-ci sont par la suite couplées pour former la T3 dans le cas d'un couplage d'une molécule de MIT et d'une molécule de DIT ou la T4 s'il y a couplage de deux molécules de DIT. La structure des hormones thyroïdiennes est présentée à la **table 1.1**. Les hormones thyroïdiennes demeurent dans la thyroglobuline jusqu'à ce qu'une stimulation de la TSH "Thyroid stimulating hormone" provoque l'hydrolyse et la sécrétion des hormones. La T4 et la T3 sont transportés dans le sang liés à la TBG "thyroxine binding globuline" et la TBPA (préalbumine liant la thyroxine). La fraction non liée pénètre dans la cellule et est responsable de l'activité biologique.

Table 1.1 : structure chimique et activité biologique des hormones thyroïdiennes. (Tirée de Greenspan et Gardner, 2001.)

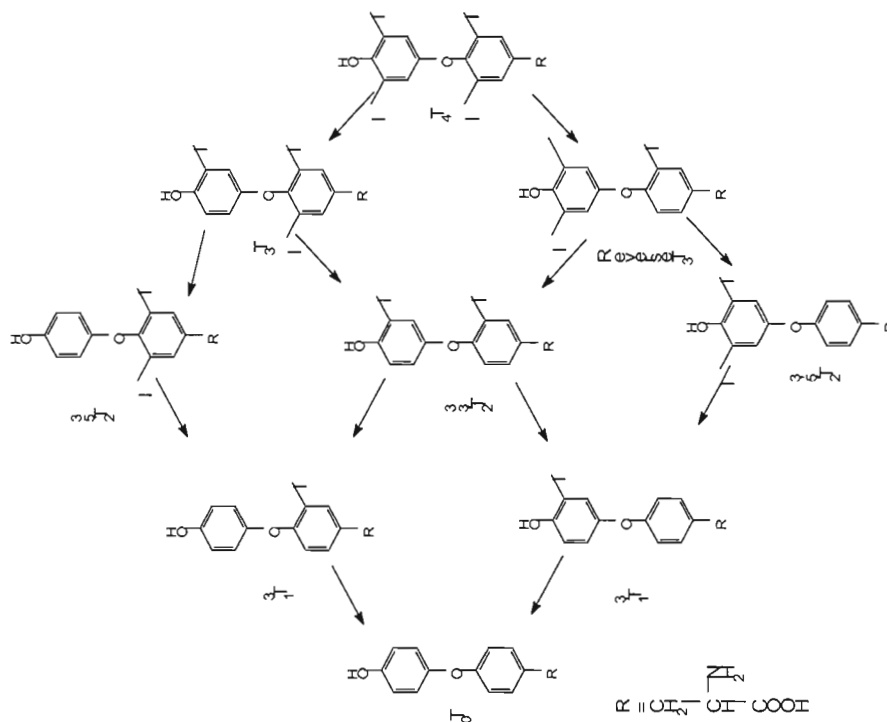
	Hormone	Nom usuel	Activité Biologique
	L-3,5,3',5'- Tetraiodothyronine	L- Thyroxine ; T ₄	100
	L-3,5,3'- Triiodothyronine	T ₃	300-800
	L-3,3',5'- Triiodothyronine	Reverse T ₃ ; rT ₃	<1
	DL-3,3'- Diiodothyronine	3,3'-T ₂	<1-3
	DL-3,5,- Diiodothyronine	3,5-T ₂	7-11
	DL-3',5'- Diiodothyronine	3',5'-T ₂	0
	L-3,5,3',5'- Acide tétraiodothyroacétique	Tetrac	?10-50
	L-3,5,3'- Acide triiodothyroacétique	Triac	?25-35

Chez l'humain, le poulet et le rat, la glande thyroïde produit en majorité de la T₄ (Astier, 1980 ; Lam *et al.*, 1986 ; Visser, 1988, Kohrle *et al.*, 1991, Leonard, 1990).

La désiodation extrathyroïdienne transforme la T4 en T3. Comme la T3 lie le récepteur thyroïdien dans les cellules cibles avec 10 fois plus d'affinité que la T4, elle serait la forme la plus métaboliquement active (Greenspan et Gardner, 2001).

L'activité biologique des hormones thyroïdiennes dépend de la localisation des atomes d'iode (*table 1.1*). Le métabolisme périphérique de l'hormone thyroïdienne est sous le contrôle des déiodinases. Les tissus possédant ces déiodinases sont à mesure de produire la T3, la forme active, pour utilisation intracellulaire ou la forme inactive, soit la T3 reverse (*figure 1.10*).

Figure 1.10 : Voies de déiodination de l'hormone thyroïdienne.
(Tirée de Greenspan et Gardner, 2001.)



Il existe trois types de déiodinases : la déiodinase de type I (DI) présente surtout dans le foie et les reins catalyse la synthèse de T3 à partir de la T4. L'activité de la DI

génère également la T3 reverse (rT3). On retrouve la déiodinase de type II (DII), surtout dans le cerveau et le tissu adipeux. Elle convertit elle aussi la T4 en T3.

La déiodinase de type III (DIII), une déiodinase dont l'action sur la T3 ou la T4 inactive les hormones par formation de la rT3 ou la 3,3'-diiodothyronine (T2), est présente dans le cerveau et la peau. La déiodothyronine de type 3 ou D3 est la voie majeure d'inactivation de l'hormone thyroïdienne.

La conversion locale de la T4 en T3 peut aussi contribuer au taux de T3 circulant. Ainsi, les niveaux circulant de T3 augmentent rapidement après un repas (Klandorf et Harvey, 1985), ceci est en accord avec le fait que l'hormone joue un rôle important dans la nutrition. Cette augmentation de la T3 serait due à une augmentation de la conversion de la T4 en T3 par les déiodinases dans le foie sous l'effet de l'insuline (Gavin *et al.*, 1980).

b-Action de l'hormone thyroïdienne

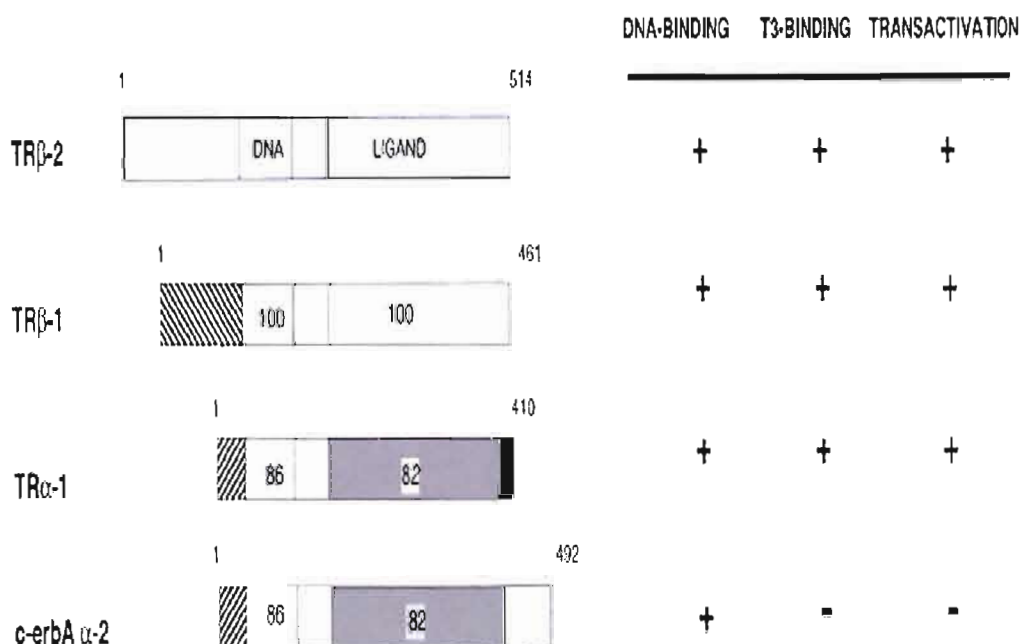
b-1 Les récepteurs des hormones thyroïdiennes

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes appartiennent au même titre que les récepteurs de glucocorticoïdes, de minéralocorticoïdes, d'androgènes, de progestérone, d'oestrogène, et de la vitamine D, à la classe des récepteurs nucléaires (Greenspan et Gardner, 2001).

Deux (2) gènes codent pour la TR, soit les gènes TR α et TR β , chaque gène donnant deux types de récepteurs : $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ou $\beta 1$ et $\beta 2$ respectivement. Les isoformes de chaque type de récepteur sont générés par épissage alternatif de l'ARNm initial. Ils diffèrent de par la taille et la séquence des acides aminés constituant la protéine (*figure 1.11*).

La concentration des types de récepteur varie également selon le tissu. Ainsi, on note une prépondérance de TR α dans le muscle et le tissu adipeux. Dans le foie, on trouve en majorité la forme TR β (Greenspan et Gardner, 2001). Ces récepteurs sont confinés au noyau et sont liés à la chromatine. Tous les isoformes de récepteurs ont la capacité de lier l'ADN et sont impliqués dans la plupart des effets développementaux, thermogéniques et morphogéniques de la T3 (Greenspan et Gardner, 2001). Il n'existe pas de différence de fonction entre les isoformes. Cependant, chez le rat l'épissage alternatif de l'ARNm du gène TR α génère une forme TRc-*erbA* α 2 dont la capacité de liaison de la T3 est réduite du fait de la perte d'une région critique au terminal carboxyle. Sa capacité de transactivation est également réduite, aussi cet isoforme de TR α n'est pas considéré comme un vrai récepteur (*figure 1.11*).

Figure 1.11 : Types de récepteurs à l'hormone thyroïdienne. (Tirée de Yen, 2001.)



Les récepteurs à l'hormone thyroïdienne contiennent plusieurs domaines : le domaine de liaison à l'ADN, "DNA binding domain" (DBD), le domaine de liaison du ligand,

"Ligand binding domain" (LBD), une région entre le DBD et le LBD appelée "Hinge region", et un domaine amino-terminal (Yen, 2001). L'importance de chacune de ces régions dans la régulation de l'activité transcriptionnelle sera abordée.

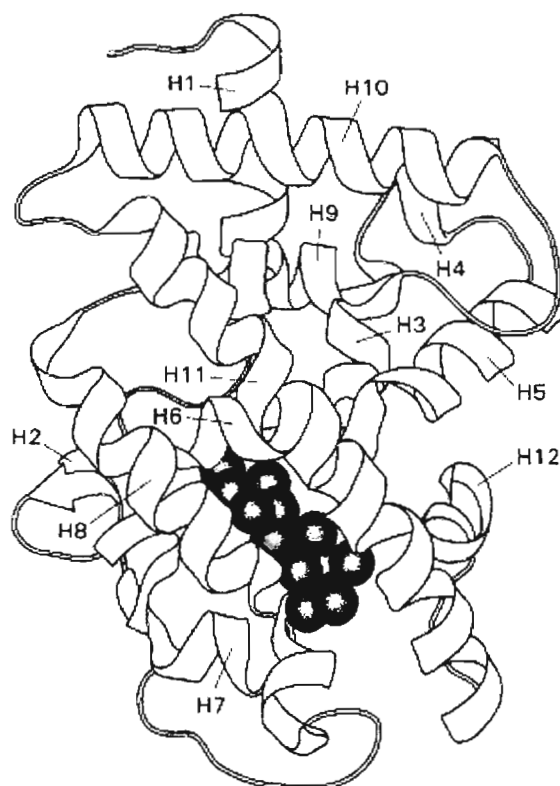
Le récepteur a une grande affinité pour une séquence particulière de l'ADN appelée élément de réponse de la T3 (TRE). Il peut se lier au TRE même en absence de T3. En général, le TRE est situé en aval du gène cible, dans le promoteur. La spécificité du récepteur provient de la séquence autour du TRE, de son orientation, de sa polarité ainsi que du nombre et de la nature des nucléotides séparant les répétitions (Greenspan et Gardner, 2001). La comparaison des TRE des gènes régulés par la T3 suggère la présence d'une séquence consensus de six nucléotides (G/A)GGT(C/G)A (Cheng SY, 2000). Cependant, il peut y avoir des variations dans le nombre, l'espacement et l'orientation des demi-sites. Les récepteurs peuvent se lier à des TRE dont les demi-sites sont disposés en palindromes (TRE pal), en répétitions directes (DRs) ou en palindromes inversés (IPs) (*figure 1.12*).

avec le RXR augmente la liaison du TR aux TRE (Sugawara *et al.*, 1993) et donc la réponse transcriptionnelle.

b-2 Régulation de la transcription des gènes par l'hormone thyroïdienne

En l'absence de T3, le récepteur à l'hormone thyroïdienne exerce une répression sur les gènes positivement régulés par la T3. L'activité répressive est influencée par le domaine de liaison du ligand du récepteur via le contrôle sur la dimérisation. La raison de cette inhibition n'est pas très connue. La liaison de l'hormone au récepteur annule cette fonction (Zhang *et al.*, 1991). La T3 et la T4 circulent liées aux protéines de liaison de l'hormone thyroïdienne (TBPs) (Greenspan et Gardner 2001). La T3, une molécule lipophile, diffuse à travers la membrane plasmique de toutes les cellules mais ne se lie qu'en présence de son récepteur. Le complexe hormone-récepteur subit alors une réaction d'activation et on observe alors des changements de conformation du domaine de liaison du ligand. Le ligand a un rôle important dans l'établissement de la conformation active du récepteur (Wagner *et al.*, 1995) (*figure 1.13*). Suite à la liaison de T3 au récepteur, celui-ci se lie en hétérodimérisation avec RXR sur le TRE (*figure 1.13*). Ainsi, en se liant à son récepteur, la T3 module l'activité transcriptionnelle. La majorité des effets de la T3 se ferait par l'intermédiaire de la transcription (Guyton and Hall, 2000).

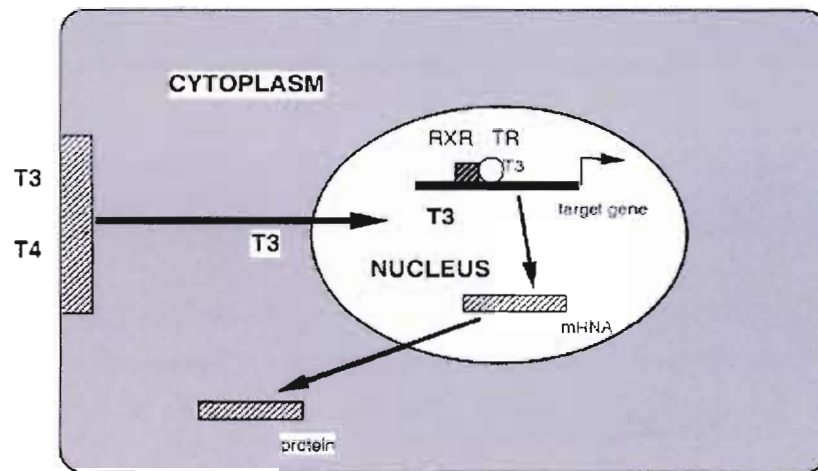
Figure 1.13 : Structure cristalline du domaine de liaison du ligand du TR α -1.
(Tirée de Wagner *et al.*, 1995.)



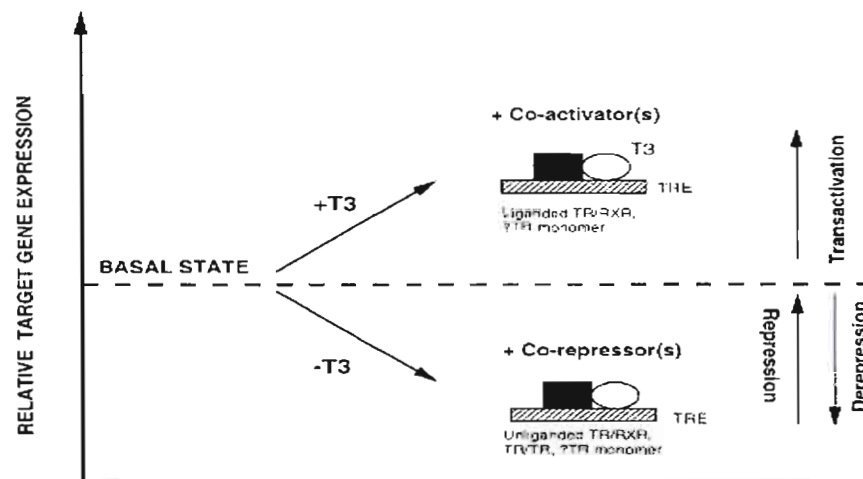
H = hélice- α . La masse noire représente le ligand.

Figure 1.14: Modèle général de l'action de l'hormone thyroïdienne dans le noyau. (Tirée de Yen, 2001.) **A)** Modèle général d'action de l'hormone thyroïdienne **B)** Evènements en présence et absence de l'hormone thyroïdienne

A



B



Dans les études menées par Hadzic et ses collègues (1995) chez le poulet, la portion N- terminale du récepteur est nécessaire pour l'action inductrice de la T3. En effet, la délétion de 50 a.a. dans cette portion entraînait une perte de la réponse inductrice.

Les études menées par Guo et ses collaborateurs (1995) indiquent que la liaison de la T3 à son récepteur favorisait la formation d'un complexe de transcription au niveau de la boîte TATA. La formation du complexe se fait en plusieurs étapes impliquant l'assemblage de l'ARN polymérase et des facteurs de transcription au niveau de la boîte TATA. Le facteur de transcription TFIID se lie en premier. Le complexe TFIID-TATA est reconnu par le facteur TFIIB qui s'y associe. La présence de TFIIB dans le complexe permet le recrutement de l'ARN polymérase II. Le complexe DBpol1FEH qui en résulte, en présence de triphosphate ribonucléosique, induit la synthèse d'ARN.

D'autres études suggèrent l'existence de molécules répressives. Les molécules répressives auraient la capacité d'induire la répression sans affecter la fonction transactivatrice du récepteur. Pour la plupart, elles interagissent avec la "hinge region" (Nawaz *et al.*, 1995). Parmi les molécules qui ont été identifiées figure le NCoR "nuclear receptor corepressor" qui produit une action répressive en interagissant avec TFIIB (Horlein *et al.*, 1995).

Les co-répresseurs peuvent également former des complexes avec d'autres molécules répressives telles que Sin 3 et la déacétylase d'histone 1 (HDAC1). Heinzl et ses collaborateurs (1997) ont noté que l'addition d'anticorps contre Sin 3 bloque la répression basale médiée par N-CoR. De plus, HDAC1 co-immunoprécipite avec Sin 3. Il est donc possible que la déacétylation de l'histone joue un rôle dans la répression basale médiée par les récepteurs nucléaires en agissant sur la structure de la chromatine (*figure 1.14*).

La liaison de la T3 à son récepteur induit des changements de conformation entraînant une dissociation avec les molécules répressives. Le TR lié est alors en mesure de se lier avec des molécules coactivatrices (Zhang et Lazar, 2000 ; Greenspan et Gardner 2001; Cheng, 2000).

La "CREB binding protein" ou CBP est un des co-activateurs pouvant être recruté suite à l'activation du récepteur. Elle interagit avec plusieurs facteurs liant l'ADN tels que CREB, C-Jun. Du fait de cette capacité à lier plusieurs facteurs, et ainsi agir comme relais entre les différents activateurs et la machinerie de transcription, la CBP est considérée comme un co-intégrateur de différents signaux (Dennler *et al.*, 2005 ; Janknecht, 1996). La CBP se lie au site de liaison de l'hormone sur le récepteur par sa portion amino-terminale (Cheng, 2000). Elle possède une activité histone acétylase (HAT). Ce constat serait en accord avec la modification de la chromatine par acétylation comme importante dans le processus d'initiation de la transcription par le récepteur à la T3 (Cheng, 2000).

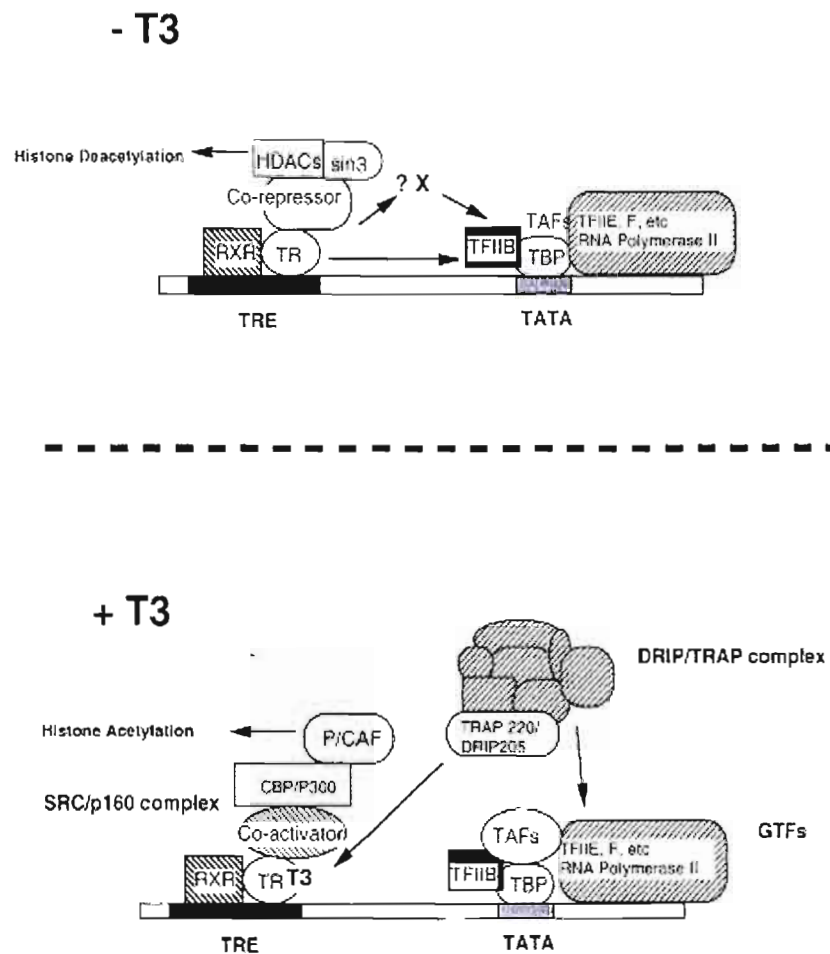
Les complexes DRIPS "vitamin D receptor interacting proteins" et TRAPs "Thyroid hormone receptor associated proteins" facilitent l'activation en favorisant le recrutement de l'ARN polymérase II. (Yen, 2001)(*figure 1. 15*).

Le complexe TR-coactivateur ainsi formé active la transcription des gènes. En modifiant de façon sélective la transcription des gènes, la production des ARNm respectifs est modulée.

Comme pour plusieurs récepteurs nucléaires, la phosphorylation est impliquée dans la transcription de gène induite par la T3 (Roncero et Goodridge, 1992). On note que les inhibiteurs de protéine kinase inhibent alors que les inhibiteurs de protéine phosphatase augmentent l'effet de la T3 sur la transcription (Naoya *et al.*, 1999 ; Thurmond *et al.*, 1998). Le mécanisme est encore inconnu. Les études par Xiao et collègues (2005) suggèrent que la T3 pourrait avoir une action non génomique. Ils ont observé, dans des fibroblastes de la peau, que la liaison de la T3 à son récepteur entraînait l'activation de mTOR "mammalian target of rapamycin" suite à des

événements de phosphorylation. L'activation de mTOR se faisait par l'intermédiaire de la cascade de signalisation phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K)-AKT/ protéine kinase B (PKB). Le TR lié induit l'activation de PI3-K et AKT/PKB. Suite à cette activation, AKT/PKB se retrouve au niveau du noyau où il phosphoryle la protéine mTOR nucléaire.

Figure 1.15 : Modèle moléculaire de répression basale en l'absence de T3 et d'activation en présence de la T3. (Tirée de Yen, 2001.)



X= cofacteurs potentiels encore non identifiés

b-3 Régulation de la transcription du gène de l'acide gras synthase par la T3

Dans les études effectuées par Kameda et Goodridge (1991), sur la région flanquante 5' du gène de la FAS de l'oie, qui est par ailleurs celui qui est utilisé au laboratoire, on localise deux éléments de réponse à l'hormone thyroïdienne: un en position -91 et l'autre en position -106. Ces éléments de réponse ont été identifiés par analyse informatique. Il n'y a pas eu plus d'études sur ces régions. Une analyse informatique a été également réalisée au laboratoire sur le même promoteur. Celle-ci montre une forte analogie avec celle réalisée par Kameda et Goodridge dont 100% en position -91 et -106. Les études de transfection avec un fragment du promoteur de 1450 pb dans des cellules HepG2 ont permis d'identifier une autre région répondant à la T3 allant de -765 à -663. L'alignement des séquences avec celles tirées de l'article de Wang et collaborateurs (2004) montre que cette région est fortement conservée entre le poulet et l'oie, ceci indiquant une action directe de la T3 sur le gène de la FAS. Dans leurs expériences sur des hépatocytes de poulet incubés en présence d'insuline, Kameda et Goodridge(1992) ont noté que la transcription est stimulée de 2 à 4 fois après 1 heure, 4 à 6 fois en 12 heures et environ 10 fois après 24 heures du traitement avec la T3. L'augmentation rapide en 1 heure est en accord avec la stimulation directe de la T3 sur le gène. L'augmentation lente (phase tardive) entre 1 et 24 heures suggère un mécanisme additionnel, soit une induction par l'intermédiaire d'une protéine additionnelle. L'utilisation de la puromycine et la pactamycine, des inhibiteurs de synthèse protéique, inhibe l'accumulation d'ARNm de la FAS (Wilson *et al.*, 1986). Les deux phases, lente et tardive, sont sensibles à la présence des inhibiteurs.

Ils pourraient agir sur la synthèse d'une protéine accessoire dont la demi-vie est courte. Ainsi, la phase tardive de la réponse peut être due à une protéine dont l'expression est modulée par la T3 (Kameda et Goodridge, 1991, Wilson *et al.*, 1986). Dans la régulation du gène de la FAS, seule, la T3 entraîne une augmentation de 3

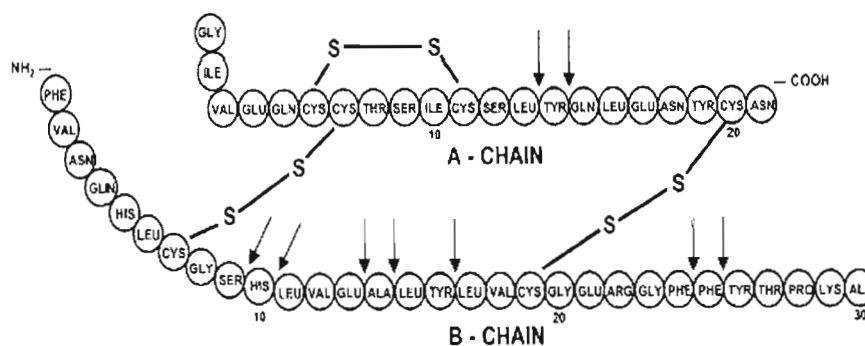
fois. En présence d'insuline, l'augmentation notée varie de 9 à 14 fois. Il y aurait donc un effet synergique entre la T3 et l'insuline, la T3 ayant un effet inducteur plus efficace en présence d'insuline (Wilson *et al.*, 1986).

2) Régulation par l'insuline

a- L'insuline

L'insuline est une hormone peptidique composée de deux chaînes d'acides aminés connectées par des ponts disulfure (*figure 1.16*). L'insuline est d'abord synthétisée sous forme d'une préprohormone par les cellules bêta du pancréas. Dans le réticulum endoplasmique, la préprohormone est clivée pour former de la proinsuline. Le clivage de la proinsuline au niveau de l'appareil de Golgi entraîne la formation d'insuline, une protéine de 51 acides aminés et une autre protéine, le peptide C. L'insuline est alors stockée dans des granules de sécrétion (Guyton and Hall, 2000). L'augmentation de glucose plasmatique est le facteur régulateur physiologique le plus important de la sécrétion d'insuline (Murray *et al.*, 1995). Le taux circulant d'insuline augmente 2 à 6 fois après une diète riche en hydrate de carbone (Moustaid et Sul, 1991).

Figure 1.16 : Structure primaire de l'insuline. (Tirée de Duckworth *et al.*, 1998.)



Les flèches indiquent les sites de dégradation par l'IDE (enzyme dégradant l'insuline)

L'insuline n'est pas associée à des protéines porteuses dans le plasma. Elle a une courte demi-vie de 4-6 min (Duckworth *et al.*, 1998). Le foie est le site majeur de dégradation de l'insuline. Environ 50% de l'insuline est enlevée de la circulation lors de son passage au niveau du foie et l'IDE "insulin degrading enzyme", une insulinasé, est responsable de cette dégradation (Duckworth *et al.*, 1998). Tetsuo et Tsuchikura (1972) ont étudié la dégradation de l'insuline dans les foies de rats à jeûn, normalement nourris ou diabétiques. Chez les rats diabétiques ou à jeûn, la dégradation de l'insuline était faible comparativement aux rats normalement nourris. Le taux de dégradation corrélant avec les niveaux de glutathion réduit, ils ont noté que, chez les rats diabétiques, le taux de dégradation n'équivalait pas celui des rats nourris même après rajout de glutathion dans le milieu. Cependant, en ajoutant de l'insuline, les taux de dégradation étaient similaires. De plus, la dégradation augmentait parallèlement à la concentration d'insuline dans le milieu.

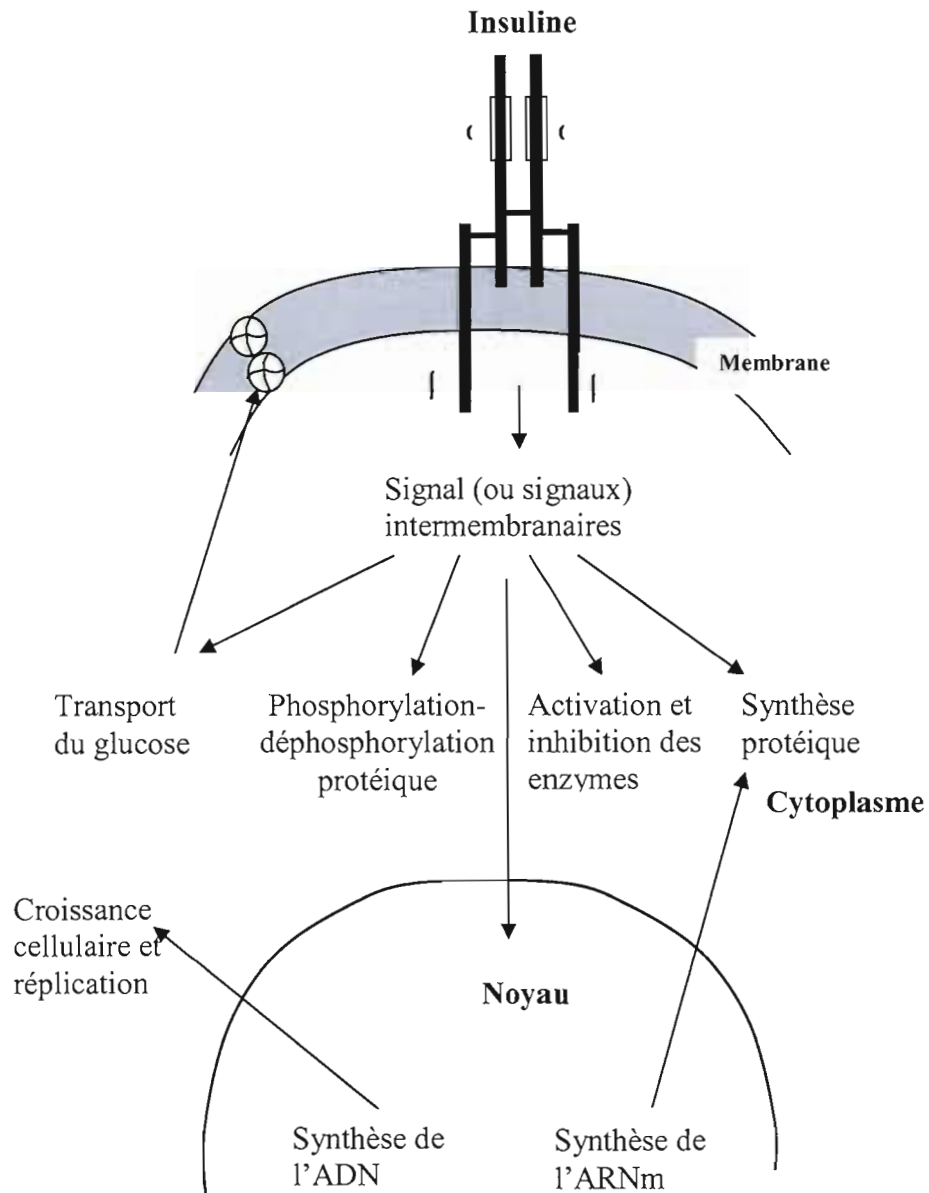
Ainsi, la dégradation d'insuline au niveau du foie est un processus régulé qui pourrait contribuer au contrôle du taux d'insuline plasmatique (Uete et Tsuchikura, 1972). La dégradation de l'insuline dépend de sa liaison à son récepteur suivi de l'internalisation et de l'association du complexe insuline-récepteur aux lysosomes où a lieu la dégradation (Duckworth *et al.*, 1998). La dégradation de l'insuline dépend surtout de la liaison de l'insuline à son récepteur. Aussi tous les tissus qui sont sensibles à l'action de l'insuline sont à mesure de la dégrader, le rein étant l'organe majeur de dégradation de l'insuline après le foie (Duckworth *et al.*, 1998).

b- Action de l'insuline

Les effets de l'insuline peuvent être immédiats ou tardifs (**Tableau 1.2**). L'insuline est beaucoup impliquée dans le métabolisme du glucose. L'un de ses effets précoces est l'augmentation du transport du glucose dans les cellules en stimulant la migration des transporteurs de glucose vers la membrane (**figure 1.17**). Elle favorise aussi le transport d'autres substrats, tels les acides aminés (Guyton et Hall, 2000). Dans le métabolisme du glucose, elle favorise la transformation des sucres en glycogène et en triglycérides.

L'insuline agirait également sur la transcription des gènes d'enzymes lipogéniques tel l'ATP Lyase (Spence *et al.*, 1979), l'enzyme malique et l' α glycérophosphate déhydrogénase mitochondriale (Wilson et Mc Murray, 1981), l'acétyl-CoA carboxylase (Katz et Ick, 1981), la glucose-6-phosphate déhydrogénase (Kurtz et Wells, 1981), la pyruvate kinase (Fleig *et al.*, 1984) et la FAS (Hillgartner et Charron, 1998 ; Lakshmanan *et al.*, 1972).

Figure 1.17: Effets de l'insuline sur la cellule. (Tirée de Murray *et al.*, 1995)



Le signal ou signaux produit(s) suite à l'interaction de l'insuline et son récepteur module un très grand nombre d'évènements intracellulaires.

Tableau 1.2 : Déroulement des effets de l'insuline. (Tiré de Lodish *et al.*, 1997.)

Secondes	Fixation au récepteur d'insuline Autophosphorylation du récepteur Stimulation de l'activité de tyrosine- Protéine kinase du récepteur
Minutes	Stimulation de l'entrée d'hexoses Modification d'activités d'enzymes Intracellulaires ; changement de la Régulation de certains genes ; désensi- bilisation par l'insuline, dûe a l'in- ternalisation du récepteur ; phospho- rylation du récepteur d'insuline par d'autres protéines Kinases.
Heures	Induction de la synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines et de lipides ; Prolifération cellulaire Désensibilisation maximale des cel- lules sensibles à l'insuline

L'insuline agit sur le métabolisme cellulaire en se liant à son récepteur présent à la surface de la cellule. C'est le récepteur activé et non l'insuline en elle-même qui est responsable des effets induits par l'insuline. Les récepteurs de l'insuline sont des glycoprotéines de 4 sous-unités liées par des ponts disulfures: deux sous unités extracellulaires α qui sont hors de la membrane plasmique et deux sous-unités β qui traversent la membrane, pénétrant dans le cytoplasme (Guyton et Hall, 2000).

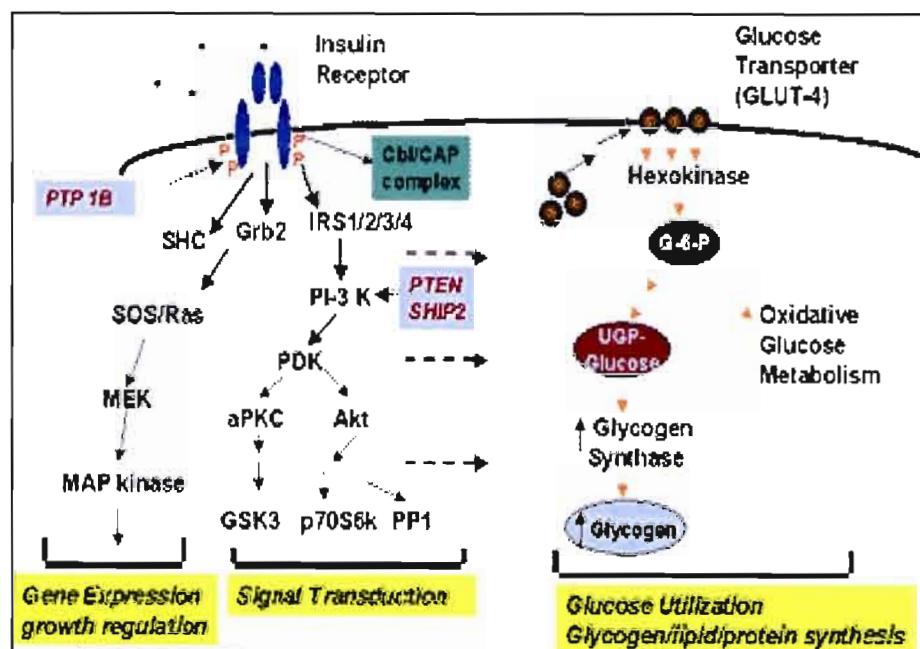
L'insuline se lie aux sous-unités α . Suite à cette liaison, les sous unités α et β changent de conformation. Les changements de conformation des sous unités β entraînent l'activation de la fonction protéine tyrosine kinase intrinsèque activant

ainsi des cascades de phosphorylation. Les voies de signalisation de l'insuline sont nombreuses et variées. Certaines sont mieux caractérisées (*figure 1.18*).

Après son activation, le récepteur phosphoryle plusieurs molécules intracellulaires telles que IRS1/2/3/4 "Insulin receptor substrate family", Shc, Gab, et cbl, qui agissent comme médiateurs intracellulaires de l'action de l'insuline (Pessin *et al.*, 2000). L'IRS-1 est considérée comme la protéine relais majeure (Lodish *et al.*, 1997). La molécule d'IRS1 phosphorylée peut à son tour recruter plusieurs autres molécules dont GRB2 et la PI3-K. Ce recrutement permet l'activation de la PI3-K, entraînant la phosphorylation de PI(4,5) biphosphate en PI (3,4,5)-P3. Le PI (3,4,5)P3 permet le recrutement à la membrane de la protéine kinase B (PKB/AKT) et son activation.

Par l'intermédiaire de GRB2, l'insuline a une influence sur la voie de Ras entraînant l'activation de la voie des MAP kinases. L'IRS-1 se fixe également à SHIP, une protéine tyrosine phosphatase. Quand elle est activée, elle pourrait déphosphoryler IRS1 et mettre fin à la signalisation de l'insuline (Lodish *et al.*, 1997).

Figure 1.18 : Voies de signalisation influencées par l'insuline et implication de l'insuline dans le métabolisme du glucose. (Tirée de Bei Zhang, 2002.)



Enfin, l'insuline a un effet inducteur sur plusieurs enzymes lipogéniques. Dans les cultures, l'insuline utilisée seule stimule les activités d'enzymes lipogéniques telles l'ATP Lyase (Spence *et al.*, 1979), l'enzyme malique et l' α glycéro-phosphate déhydrogénase mitochondriale (Wilson et Mc Murray, 1981), l'acétyl-CoA carboxylase (Katz et Ick, 1981), la glucose-6-phosphate déhydrogénase (Kurtz et Wells, 1981), la pyruvate kinase (Fleig *et al.*, 1984) et la FAS (Hillgartner et Charron, 1998 ; Lakshmanan *et al.*, 1972).

Pour la plupart des enzymes, l'insuline utilisée seule stimule faiblement au niveau transcriptionnel, soit de l'ordre de deux fois. L'addition d'autres hormones telles que les glucocorticoïdes (Wilson et Mc Murray, 1981 ; Katz et Ick, 1981 ;

Kurtz et Wells, 1981 ; Fleig *et al.*, 1984) ou la T3 (Spence *et al.*, 1979 ; Hillgartner et Charron, 1998 ; Mariash *et al.*, 1981) potentialisent l'effet de l'insuline. La régulation de l'activité de la FAS par l'insuline est étudiée dans le présent rapport.

C- Régulation de l'activité de la FAS par l'insuline

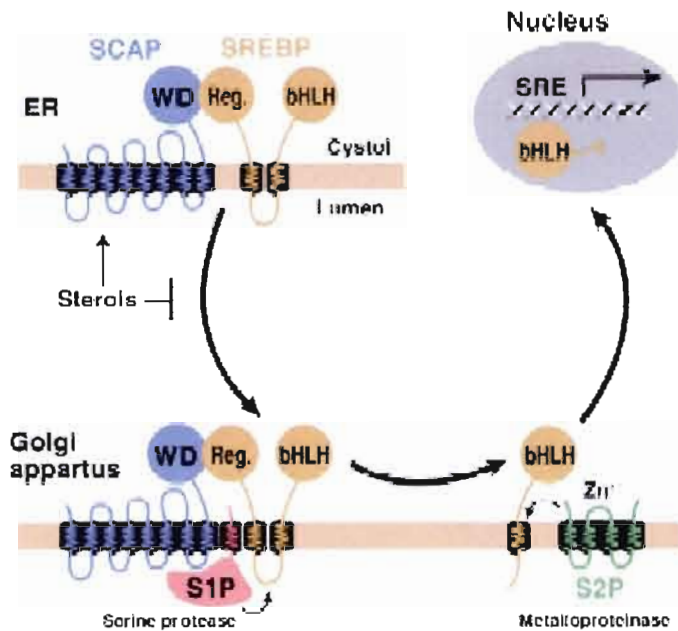
Dans la régulation de l'activité de la FAS, l'insuline agirait au niveau de la transcription. Des études effectuées par Joshi et Aranda (1979) montrent que le blocage de la transcription par la cordycépine entraîne une inhibition de l'activation de la FAS induite par l'insuline, laissant supposer que cette hormone régule l'activité de l'enzyme au niveau de la transcription.

La régulation du promoteur de la FAS par l'insuline est médiée par la voie des PI3-K et la protéine kinase B/ AKT est un des effecteurs impliqués en aval de cette voie (Sul *et al.*, 2000). Le SREBP-1 " Sterol regulatory element binding protein" est considéré comme un médiateur de l'action de l'insuline sur les gènes lipogéniques (Horton *et al.*, 2002). SREBP est un facteur de transcription qui appartient à la classe des "helix-loop-helix leucine zipper" (bHLH-Zip). Il est synthétisé sous forme de précurseur inactif de 125 kDa lié au réticulum endoplasmique (Sato *et al.*, 1994) . Pour devenir actif, le précurseur est transporté vers l'appareil de Golgi où, après clivage de la partie N-terminale par deux protéases, S1P (serine protéase 1) et S2P (serine protéase 2) est générée la forme mature de 68 kDa : SREBP-1.

La forme mature est alors transportée vers le noyau où elle se lie au promoteur des gènes. Quand les niveaux de stérol sont bas, SREBP se lie à la protéine SCAP "SREBP cleavage activating protein" et est transporté vers l'appareil de Golgi où a lieu la protéolyse. Quand la concentration en stérol est élevée, la protéine INSIG se lie à SCAP empêchant ainsi la formation du complexe SCAP/SREBP (*figure 1.19*). Ainsi la transcription des gènes impliquant SREBP est réduite. Il existe plusieurs

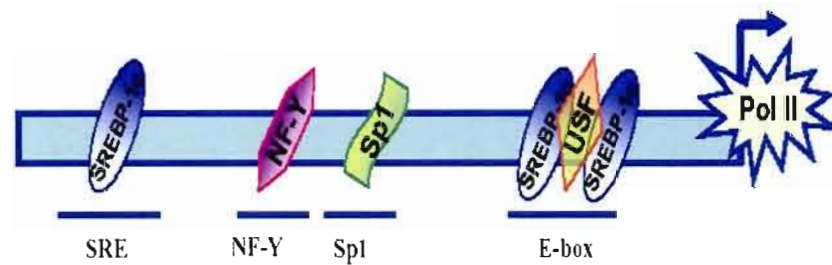
types de SREBP. SREBP-1c est plus impliqué dans la régulation des enzymes impliqués dans la synthèse des acides gras. L'insuline augmente la quantité de précurseur SREBP-1c via l'activation de la voie des PI3-kinases (Azzout-Marniche *et al.*, 2000). SREBP se lie à des séquences d'ADN appelées SRE "Sterol regulatory element" (*figure 1.20*). Sur le promoteur du gène FAS, trois sites de liaison de SREBP 1c ont été identifiés. Les études avec les souris transgéniques ont permis d'identifier le SRE situé à -150 comme le site d'action physiologique de SREBP 1-c (Griffin *et al.*, 2004 ; Latassa *et al.*, 2003). La liaison de SREBP-1c sur ce site résulte en l'activation maximale de la transcription de la FAS à travers son interaction avec USF "upstream stimulatory factor" lié à la Ebox situé à -65bp (Latassa *et al.*, 2003). SREBP-1c seul est un faible activateur de la transcription. D'autres facteurs tels Sp1 Serine protéase 1 , et NFY "nuclear factor Y" sont requis (Magana *et al.*, 2000). De plus, dans les cultures d'hépatocyte, les mutations affectant les sites de liaison de SREBP sans affecter ceux de Sp1 et NFY entraînaient une abolition de l'effet de l'insuline et du glucose sur la transcription du gène FAS (Magana *et al.*, 2000). De plus, l'activité de SREBP semble être augmenté par la phosphorylation sur les résidus serine/thréonine suite à une stimulation de l'insuline (Kotzka *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2000)

Figure 1.19 : Modèle de clivage protéolytique et d'action de SREBP (Tirée de Horton *et al.*, 2002.)



ER : Réticulum endoplasmique ; S1P : Serine protéase 1 ; S2P : Serine protéase 2 ; bHLH : Forme mature de SREBP

Figure 1.20 : Médiateurs de l'effet de l'insuline sur le promoteur du gène FAS (Tirée de Mounier et Posner, 2005.)



CHAPITRE II

MATERIELS ET MÉTHODES

CHAPITRE II

MATERIELS ET MÉTHODES

2.1 Produits chimiques.

Tous les produits chimiques utilisés à l'exception de la Collagénase H et du réactif Bio-Rad ont été achetés chez Sigma (Saint Louis, Missouri, USA). La Collagénase H a été achetée chez Roche Diagnostics (Biobar Roche UQÀM) et le Bio-Rad pour la quantification protéique provient de Bio Rad Laboratories Ltée. Les acides gras (hexanoate et octanoate et les différents dérivés), ainsi que les inhibiteurs de kinase (H7 et génistéine) proviennent également de chez Sigma. Enfin tous les produits radioactifs utilisés proviennent de chez Sigma.

2.2 Utilisation du modèle animal: le poulet

Chez l'humain et les oiseaux, le foie est le principal site de la synthèse des acides gras. Chez le rat en croissance, le tissu adipeux est le siège de la lipogenèse mais, chez le rat adulte, le foie devient le principal organe de synthèse (Gandemer, 1979). Les activités des enzymes lipogéniques sur des hépatocytes de rat en culture sont plus faibles que les activités enregistrées lorsque que les rats sont nourris avec une diète riche en hydrate de carbone ou lorsque des rats thyroïdectomisés sont traités à la T3. On ne sait pas si ces effets sont dus à une perte de réponse à la stimulation hormonale (Mariash *et al.*, 1980 ; Volpe et Vagelos, 1976). Dans les hépatocytes isolés d'embryon de poulet, on observe une forte induction de l'activité des enzymes lipogéniques lorsque les cellules sont soumises à des stimulations hormonales.

L'activité des enzymes est faible dans les hépatocytes d'embryon de poulet de 17 à 20 jours. Les quantifications de la T3 dans les hépatocytes de poulet révèlent de faibles taux d'hormone thyroïdienne jusqu'à l'éclosion de l'œuf (Reyns *et al.*, 2003). En absence de stimulation hormonale exogène, l'état nutritionnel de l'hépatocyte serait donc similaire à celui à jeûn. L'insuline seule cause un faible changement. La présence simultanée d'insuline et de T3 induit des niveaux d'activité comparable à l'état nourri (Joshi, 1981). Aussi, les hépatocytes de poulet constituent un matériel biologique idéal pour l'étude de l'action de la T3.

Pour évaluer la régulation transcriptionnelle de la FAS par les acides gras à chaîne moyenne, nous utilisons des hépatocytes préparés à partir d'embryon (19 jours) de poulet de la lignée de Leghorn.

2.3 Préparation des hépatocytes et culture (CEH).

Les oeufs sont fournis par le couvoir Simentin Mirabel (Montréal, Québec, Canada) et incubés pendant 19 jours à 39°C et 60% d'humidité. Les embryons sont tués par décapitation. Les hépatocytes sont prélevés selon le protocole mis au point par Goodridge (Roncero et Goodridge, 1992). Brièvement, après ouverture de l'abdomen, les foies sont prélevés sans la vésicule. Les foies sont grossièrement hachés puis digérés par la collagénase H (0,5 mg/ml) dans du MKRBB "Modified Krebs ringer bicarbonate buffer" pendant 1h à 37°C sous agitation constante avec une gazéification sous 95% O₂ et 5% CO₂ chaque 20 minutes pendant 1 minute. Une suspension homogène est ensuite obtenue par filtration à travers 2 couches de bas de nylon. Après une série de centrifugation à 200 g pendant 5 minutes à 4°C, le culot obtenu est resuspendu dans du milieu de culture Waymouth contenant de la pénicilline (60 ng/ml) et de la streptomycine (100 ng/ml). Les hépatocytes (1,5-1,8.10⁶ cellules pour 2 ml de milieu) (Baillie *et al.*, 1993) sont incubés à 40°C et en atmosphère de 5% CO₂) dans des plaques de 6 puits de 35 mm soit l'équivalent d'une

(01) plaque. Après 20 heures d'incubation, les cellules sont lavées au PBS "Phosphate buffer saline solution" et le milieu de culture est changé pour un autre milieu de culture de même composition.

Les différentes stimulations hormonales à la T3, à l'insuline, ou à la T3 plus insuline sont débutées. Parce que la T3 est rapidement dégradée dans un milieu Waymouth sans sérum, des concentrations de 1,6 μM ont été utilisées pour s'assurer qu'elle était en concentration optimale pendant toute l'incubation (Roncero et Goodridge, 1992). L'insuline a été utilisée à une concentration de 100 nM pour assurer une saturation complète de ses récepteurs. Les cellules sont incubées dans ces nouvelles conditions pendant une période additionnelle de 24 heures. Dans le cas des traitements avec les acides gras, ceux-ci sont ajoutés à une concentration de 1mM (Thurmond *et al.*, 1998). L'incubation avec les acides gras est toujours de 24 heures avant la détermination de l'activité enzymatique. Les acides gras utilisés pour ces expériences les acides gras utilisés sont l'hexanoate, l'octanoate, le bromohexanoate et le trihexanoate et la carnitine-hexanoate. Avant leur ajout au milieu de culture, l'hexanoate, l'octanoate et la carnitine-hexanoate ont été suspendus dans l'eau. Les trihexanoate ont été complexés avec l'albumine.

Des traitements ont également été effectués avec des inhibiteurs de kinase que sont la H7 (Un inhibiteur de serine/thréonine) et la génistéine (un inhibiteur de tyrosine kinase). La H7 a été suspendue dans du HCl (1M) tandis que la génistéine a été suspendue dans le DMSO. La H7 a été utilisée à une concentration de 25 μM et la génistéine à une concentration de 5 μM . La culture est débutée dans les mêmes conditions de culture décrites ci haut. Après 20 heures d'incubation, les cellules sont lavées au PBS "Phosphate buffer solution" et le milieu de culture est changé pour un autre milieu de culture de même composition. Les inhibiteurs de kinase sont ajoutés au milieu 30 minutes avant le début des stimulations à la T3, à l'insuline, ou à la T3 plus insuline. Les incubations se poursuivent pendant 24 heures.

Dans les deux types de traitements, aux acides gras ou aux inhibiteurs de kinase, la viabilité cellulaire est peu affectée. En effet lorsque l'on compare les quantités de protéines récoltées dans les conditions avec les acides gras ou les inhibiteurs ne sont pas moindres que celles récoltées avec les conditions respectives de stimulation hormonale (résultats non montrés).

2.4 Détermination de l'activité enzymatique.

Vingt quatre heures après les stimulations, les hépatocytes sont récoltés. Pour la récolte des cellules, les hépatocytes sont décollés de la plaque en utilisant un grattoir. Durant cette étape, ils sont conservés dans le milieu de culture. Après grattage, les hépatocytes et le milieu de culture sont transférés dans un tube. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 460 g pendant 5 minutes et à 4°C. Le culot obtenu est resuspendu dans le PBS. Ce lavage des hépatocytes est suivi d'une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions que la première. Afin d'éviter la variabilité par puits et obtenir une quantité suffisante d'extraits pour les essais enzymatiques, une plaque est utilisée pour chaque condition de stimulation. Les hépatocytes sont lysés dans 500 µL de tampon d'homogénéisation (0,1 M potassium phosphate pH 7,0, 3 mM EDTA, pH 8,0, 1 mM DTT) à l'aide d'un homogénéisateur Dounce (Goodridge et *al.*, 1974). Le lysat est par la suite centrifugé à 21,000 g pendant 30 minutes à 4 °C.

Le surnageant prélevé (en évitant la couche lipidique à la surface) est aussitôt utilisé pour déterminer l'activité enzymatique de la FAS.

L'activité enzymatique est déterminée en suivant au spectrophotomètre la disparition de NADPH à une longueur d'onde de 340 nm. Cette disparition se traduit par une diminution de la densité optique (DO).

Brièvement, dans une cuvette en quartz, on mélange 840 µl de tampon de réaction (100 mM phosphate de potassium, pH 7,0, 3 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 nM

NADPH, 25 nM acétyl CoA, 100 nM malonyl CoA), et 150 µl d'extrait cellulaire. Le mélange est incubé à 40°C. Après une stabilisation du mélange pendant 5 minutes, 10 µl de malonyl CoA (10 mM) sont ajoutés (Hsu et Yin, 1970; Fisher et Goodridge, 1978; Goodridge, 1973). La lecture d'un témoin, de même composition que le test mais sans malonyl CoA est effectuée dans les mêmes conditions. La lecture de la DO est effectuée pendant 10 minutes.

Pour le calcul de l'activité enzymatique à partir des lectures de DO, la formule suivante est utilisée:

$$\frac{(\Delta \text{D.O test} - \Delta \text{D.O témoin}) \times \text{Vol. cuvette (L)} \times 10^6}{\epsilon \times \Delta \text{ temps (min)} \times \text{Vol. Lysat (L)} \times \text{concentration de protéines}}$$

Volume de la cuvette = 1 mL

$\epsilon = 6.22 \times 10^3$ L/cm/mole

$\Delta \text{ temps} = 10$ minutes Vol. Lysat = 150 µl

La quantité de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford décrite ci-dessous. Les activités enzymatiques calculées sont exprimées en nmoles de NADPH oxydées/min/mg protéine (mU). L'activité enzymatique est mesurée sur tout le lysat récolté

2.5 Dosage des protéines

Le dosage des protéines dans les hépatocytes récoltés a été effectué selon la méthode de Bradford. Le dosage est effectué le même jour que la détermination de l'activité enzymatique. Le réactif Bio Rad est acheté auprès de la compagnie Bio Rad Laboratories. Il est dilué 1 : 4 avec de l'eau nanopure. Pour réaliser le dosage, 10 µL

d'échantillon sont prélevés auxquels 490 μ l d'eau et 2 mL du réactif de Bradford dilué sont ajoutés. Le mélange est effectué au vortex. Après 5 minutes, le mélange est transféré dans une cuvette de lecture. La densité optique est lue à 595 nm. La quantité de protéines obtenue a été déterminée à partir d'une courbe standard faite avec l'albumine et selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2.6 Analyse du profil lipidique

Les cellules sont mises en plaque selon le protocole mentionné ci haut. Le profil lipidique est déterminé dans toutes les conditions de stimulation : soit celle à la T3, à l'insuline, à l'insuline plus la T3 et sans aucune stimulation. Les cellules sont incubées avec l'hexanoate marqué (2 μ Ci par plaque de 6 puits soit 0.33 μ Ci par puits) au 14 C pendant 24 heures. A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées 1 fois avec du PBS-0,2% BSA et 2 fois avec du PBS. La BSA est rajoutée afin d'arrêter la capture des acides gras. Les puits ont été bien asséchés à l'air libre.

Les lipides ont été extraits avec l'hexane. Brièvement, le mélange hexane isopropanol est préparé selon le ratio Hexane : isopropanol de 3 : 2. Deux ml de ce mélange est ajouté par puits et l'incubation se poursuit, sans agitation pendant 30 minutes. Les extraits lipidiques (phase aqueuse) sont par la suite récoltés dans des tubes de verre. 0,5 ml du mélange hexane/isopropanol est rajouté au puits pour le rincer. Cette solution de rinçage est transférée dans les tubes de verre. La solution obtenue est évaporée sous azote; Le résidu obtenu est resuspendu dans 200 μ L de chloroforme. Les échantillons (200 μ L) ainsi que les standards (20 μ L) sont appliqués au bas d'une plaque de gel de silice et migrés dans une chambre à chromatographie préalablement saturée avec un mélange d'éther de pétrole, d'éther anhydre et d'acide acétique (90 ml, 10ml et 1ml respectivement). La migration a été arrêtée lorsque le solvant a migré jusqu'à 2 cm du haut. Les lipides sont visualisés après traitement dans la chambre à iode pendant 15 minutes. Les bandes sont par la suite grattées et la radioactivité est mesurée au compteur bêta en utilisant le

programme Quanta smart. Un Vial contenant le liquide de scintillation est utilisé comme contrôle négatif. Un décompte sur un autre vial contenant 200 µl de chloroforme est également effectué afin d'exclure une interférence par le chloroforme.

2.7 Etudes de captation

Les études de captation sont effectuées sur des CEH après une stimulation de 24 heures soit à la T3, à l'insuline ou à T3 plus insuline selon la méthode décrite par Campbell et ses collègues (Campbell *et al.*, 1997; Daoud *et al.*, 2005).

Brièvement, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS à 40°C. Par la suite, les cellules sont incubées à 40 °C avec l'hexanoate marqué au C¹⁴ à raison de 0,35 µCi par puits. Après 1 heure d'incubation, 2 ml de PBS froid contenant 0,5% de BSA sont rajoutés a chaque puit afin d'arrêter la capture. Les cellules sont lavées, à température ambiante, sous faible agitation et pendant 2 minutes, 3 fois avec la même solution et deux fois avec 0.9% NaCl pour enlever tout acide gras lié à la membrane. Les cellules sont solubilisées par addition de 0,5 ml NaOH (0.1M) par puits et laissées au réfrigérateur, à 4°C, durant la nuit (overnight). A cette étape de l'incubation, les cellules sont toujours en plaque. Par la suite le lysat est récolté dans les vials de scintillation. 0,5 ml de NaOH (0,1 M) sont utilisés pour rincer le puits. Ainsi par puits, un total de 1 ml de lysat est récolté. Après mélange, 10 µL de lysat sont prélevés pour une quantification protéique. Au reste du lysat, 10 ml de liquide de scintillation sont ajoutés et la radioactivité dans la cellule est mesurée par β-scintillation en utilisant le programme quanta-smart du Laboratoire Biomed à l'UQAM. La quantité de protéines est évaluée au spectrophotomètre selon la méthode mentionnée ci haut. Afin d'exclure une surévaluation de la quantité de protéines par le NaOH, 10 µl de la solution (0,1M) sont rajoutés à chacun des standards.

2.8 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés en terme de moyenne +/- déviation standard. Les comparaisons entre les cellules cultivées sans aucune stimulation et celles cultivées avec stimulation sont faites en utilisant le *student's t test*. Les différences sont considérées comme significatives pour les valeurs $p < 0.05$.

2.9 Considération éthique

Les méthodes de prélèvements (décapitation) ainsi que l'incubation des oeufs de poulet sont approuvés par le comité d'éthique de l'Université du Québec à Montréal (UQÀM). Le protocole pour les animaux est le protocole CIPA # 500.

CHAPITRE III

RESULTATS

CHAPITRE III

RÉSULTATS

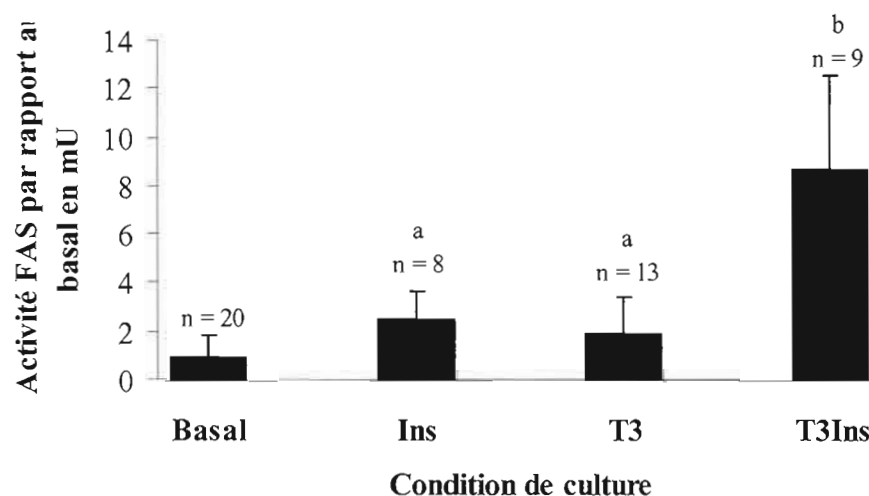
3.1) Impact des stimulations à l'insuline et à la T3 sur l'activité enzymatique de la FAS dans des (CEH).

L'effet de l'insuline et de la T3 sur l'activité de la FAS a été déterminé en mesurant l'activité enzymatique sur des cultures d'hépatocyte d'embryon de poulet (CEH) stimulées pendant 24 heures soit avec de l'insuline (100 nM), avec de la T3 (1.6 μ M), ou en utilisant simultanément les deux hormones. Les hépatocytes isolés d'embryon de poulet de 19 jours sont incubés dans le milieu Waymouth contenant 25 mM de glucose tel que décrit dans la section matériel et méthodes. À 20 heures d'incubation, le milieu est changé pour un autre de même composition. Les stimulations à l'insuline, à la T3 ou à la T3 plus insuline sont débutées. Après 24 heures de stimulation, l'activité enzymatique est déterminée tel que décrit.

Les activités enregistrées sans aucune stimulation (=Basal) sont ramenées à 1. Les activités dans les conditions avec stimulation sont comparées au niveau basal. Les activités mesurées pour l'insuline, la T3 et l'insuline plus la T3 sont respectivement $2,57 \pm 1,14$ ($p=0,0103$); $2,011 \pm 1,44$ ($p<0,001$); $8,75 \pm 3,83$ ($p<0,001$). Individuellement, l'insuline ou la T3 \pm augmente l'activité enzymatique de 2 à 2.5 fois. En présence simultanée des deux hormones, on observe un effet synergique important, l'activité de la FAS étant augmentée de 8 fois (*figure 3.1*).

Ces résultats suggèrent une interaction des voies de l'insuline et celles de la T3 dans la régulation de la FAS. Ces voies peuvent agir de façon indépendante ou elles peuvent agir toutes deux l'une sur l'autre par l'intermédiaire d'un facteur commun.

Figure 3.1 : Impact de la stimulation à l'insuline, à la T3 ou aux deux sur l'activité enzymatique de la FAS dans des hépatocytes d'embryon de Poulet (CEH). Les activités enzymatiques sont déterminées tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne d'au moins 3 expériences \pm une déviation standard. Les valeurs pour la condition basale ont été ramenées à 1.



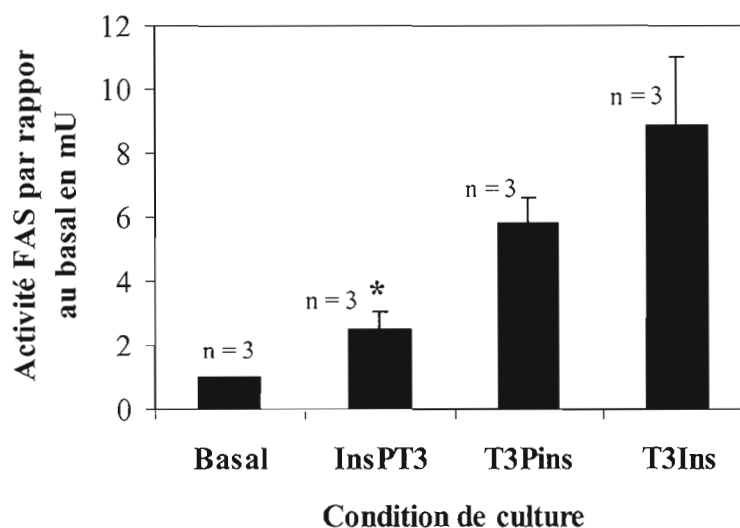
Les lettres indiquent différents degrés de significativité, a = $P < 0,05$; b = $P < 0,001$.

Afin de mieux caractériser l'effet synergique, des stimulations séquentielles ont été effectuées sur les CEH pour des temps de 10 heures suivi de 14 heures. Par exemple, dans une condition, la stimulation est débutée avec l'insuline pendant 10 heures suivi d'une stimulation avec la T3 pendant 14 heures et vice versa.

Les activités enzymatiques enregistrées dans les conditions Insuline puis T3 (InspT3) et T3 puis insuline (T3pIns) sont respectivement de $2,47 \pm 0,60$ ($p=0,1504$) et de

5.84 ± 0.81 ($p=0,0005$) (**figure 3.2**). Comparativement à la condition de stimulation T3 plus insuline ($8.06 \pm 2,58$) ($p<0,0001$), l'induction dans la condition InspT3 est plus faible ($p<0,001$). Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs d'activité enzymatique enregistrées entre T3 plus insuline et T3pIns ($p=0,0110$). De plus, la stimulation observée avec InspT3 est semblable aux inductions individuelles de la T3 ou de l'insuline. Ces résultats confirment que seuls, l'insuline ou la T3 induisent faiblement l'activité de la FAS. Ces résultats semblent suggérer que l'induction par l'insuline est limitée dans le temps. Cela n'est pas le cas avec la stimulation à la T3pIns où l'effet de la stimulation à la T3 semble perdurer. L'effet synergique est également présent indiquant que tous les facteurs impliqués dans la stimulation à la T3 plus insuline sont présents. Des stimulations de 10 heures à la T3 ou à l'insuline suivies d'une période d'incubation de culture sans aucune stimulation ont été effectuées. Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas de perte d'activité secondaire à l'arrêt de la stimulation (résultats pas montrés). Ces résultats suggèrent que l'action de la T3 perdure et que l'insuline viendrait augmenter cet effet par phosphorylation du récepteur par exemple. Lorsqu'on incube d'abord avec l'insuline, il y a activation transitoire des voies de signalisation. Aussi, les activités enzymatiques enregistrées dans la stimulation séquentielle insuline puis T3 proviendraient de l'induction par la T3. Ces résultats suggèrent une implication des voies de l'insuline sur celles de la T3.

Figure 3.2 : Impact de la stimulation séquentielle sur l'activité enzymatique enregistrée sur les CEH pendant une stimulation de 24 heures. Les activités enzymatiques sont déterminées tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne d'au moins 3 expériences \pm une déviation standard. Les valeurs pour la condition basale ont été ramenées à 1.



*Signifie $P < 0.0001$ comparativement à la stimulation T3Ins.

3.2) Implication d'évènements de phosphorylation dans la régulation de la FAS

Des travaux antérieurs ont démontré que l'état de phosphorylation des hépatocytes influence l'activité de la T3 sur la transcription. On note que les inhibiteurs de protéine kinase inhibent l'activité alors que les inhibiteurs de phosphatase augmentent l'effet de la T3 sur la transcription. Afin de vérifier ce fait dans notre système, les CEH ont été stimulés dans les mêmes conditions que présentées précédemment en présence de deux types d'inhibiteurs de kinase: la H7, qui est un inhibiteur général de serine/thréonine kinase et la génistéine, qui est un inhibiteur général de tyrosine kinase.

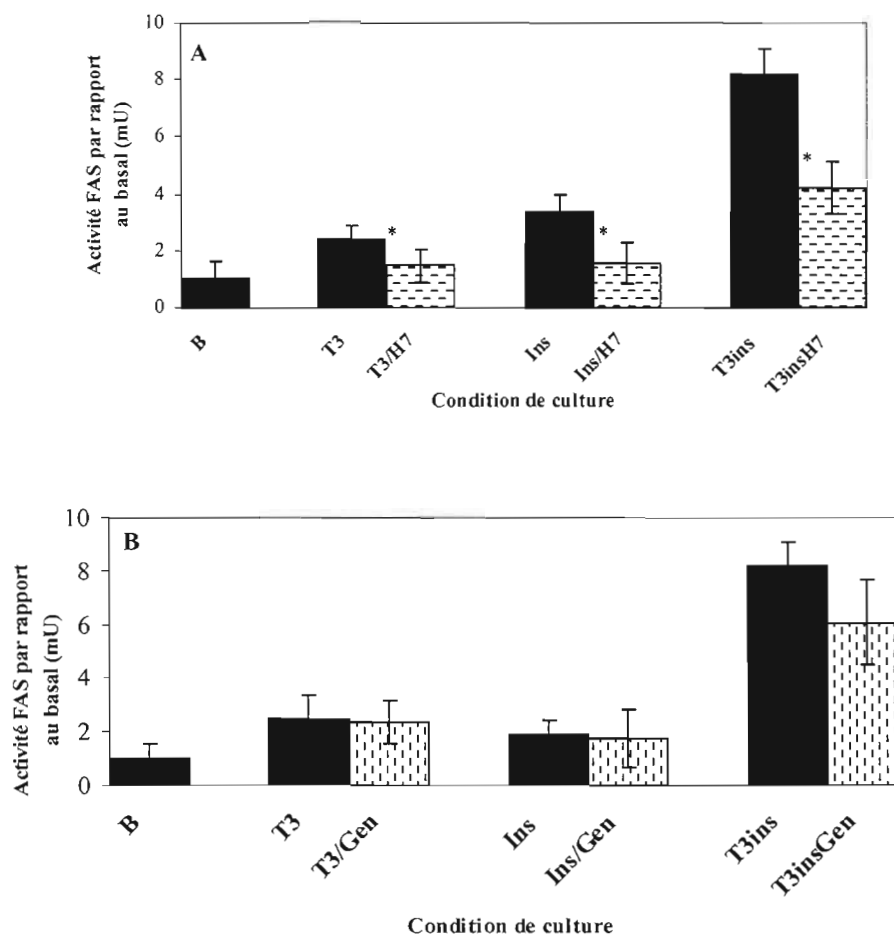
Les inhibiteurs sont rajoutés au milieu de culture 1 heure avant le début des stimulations aux hormones. La H7 est utilisée à une concentration de 25 μ M et celle de la génistéine est de 5 μ M. La H7 a été suspendue dans du HCl (1M) tandis que la génistéine a été suspendue dans le DMSO (100 %). Aussi pendant les incubations, du DMSO est rajouté à la condition basale pour éliminer des variations dues à un potentiel effet toxique sur les cellules. La quantité de DMSO dans chaque puits était de 10 μ L par puits.

Les activités enzymatiques basales ont été ramenées à 1. Avec les incubations avec la H7, on observe une réduction de l'activité enzymatique de 50% ($p=0,0031$) dans les cellules stimulées avec la T3 plus insuline en présence de H7 ($4,19 \pm 0,91$) par rapport à la stimulation à la T3 plus insuline ($8,18 \pm 0,90$). Afin de vérifier si ces inhibitions sont spécifiques de la présence simultanée des deux hormones, des essais ont été effectués sur les conditions de stimulations individuelles. Les activités enzymatiques calculées sont pour T3/H7 ($1,48 \pm 0,55$) soit une baisse de 40% ($p=0,03$) et l'insuline/H7 ($1,52 \pm 0,71$), soit une baisse de 50% ($p=0,04$), comparativement à la T3 ($2,39 \pm 0,51$) et à l'insuline ($3,36 \pm 0,61$), respectivement (**figure 3.3a**). On n'observe pas d'inhibition dans la condition basale.

Dans ces mêmes conditions de culture, l'inhibition par la génistéine est non significative. On enregistre une inhibition de 25% ($6,06 \pm 1,58$) ($p=0,098$) dans la condition de stimulation simultanée à la T3 et à l'insuline (**figure 3.3b**). En variant les concentrations de génistéine (10 μ L) et le temps d'incubation (72h), on n'observe pas de variations dans l'inhibition (résultats pas montrés). Dans les stimulations avec les hormones prises individuellement, la génistéine n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité de la FAS ($p=0,5692$ et $p=0,6093$ pour la T3 et l'insuline respectivement). Des études ont été réalisées au laboratoire au niveau du promoteur. Les mêmes tendances inhibitrices sont observées (voir Mémoire Anne Radenne). Le degré d'inhibition similaire dans toutes les conditions de stimulation laisse supposer que la phosphorylation puisse être un élément de la réponse de l'insuline et de la T3 sur

l'activité de la FAS. Pris ensemble, ces résultats suggèrent l'existence de voies de signalisation impliquant une ou des sérine/ thréonine kinase(s) dans la régulation de la FAS. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques sera nécessaire à la caractérisation de ces phénomènes de phosphorylation de même que l'étude de phosphorylation des protéines telles que le récepteur à la T3.

Figure 3.3 : Impact de la phosphorylation sur l'activité de la FAS. **A)** Culture en présence de H7 **B)** Culture en présence de la Génistéine. Les activités enzymatiques sont déterminées tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard. Les valeurs pour la condition basale ont été ramenées à 1.



B= basal ; Ins = Insuline ; TI =T3 plus insuline ; Gen = Génistéine.

* Signifie $P < 0.05$ comparativement à la condition sans inhibiteur.

3.3) L'insuline a un effet majeur sur l'induction de l'activité de la FAS par la T3

Dans les stimulations à l'insuline, en présence de la T3, on observe un effet synergique important. Les activités enzymatiques ont été mesurées sur des CEH incubés dans les mêmes conditions, insuline (100nM et T3 1.6 μ M), pendant 48 heures et 72 heures afin d'observer l'évolution de l'activité de la FAS (**figure 3.4a**). Comparativement à la condition de stimulation basale, pendant les premières 24 heures, l'activité enzymatique augmente de 8 fois. Pour les 24 heures suivantes, elle se maintient au même niveau ($p=0,001$). Cependant, entre 48 heures et 72 heures, l'activité enzymatique double ($p<0,0001$). L'induction similaire entre 24 et 48 heures pourrait être secondaire à la désensibilisation de la cellule à la stimulation par l'insuline. En effet, la liaison de l'insuline à son récepteur entraîne une endocytose et une destruction du récepteur. Il faut par la suite au moins 24 heures pour que la cellule soit à nouveau sensible à l'effet de l'insuline (Lodish *et al.*, 1995).

Dans les autres conditions de stimulation individuelle, T3 ou insuline, il n'y a pas de variation de stimulation entre 24 heures et 72 heures. Au bout de 72 heures, les activités enzymatiques calculées sont de $2,24 \pm 0,73$ pour la T3 ; et de $1,75 \pm 0,69$ pour l'insuline. Ces résultats renforcent l'hypothèse qu'individuellement ces deux hormones ont un faible effet inducteur.

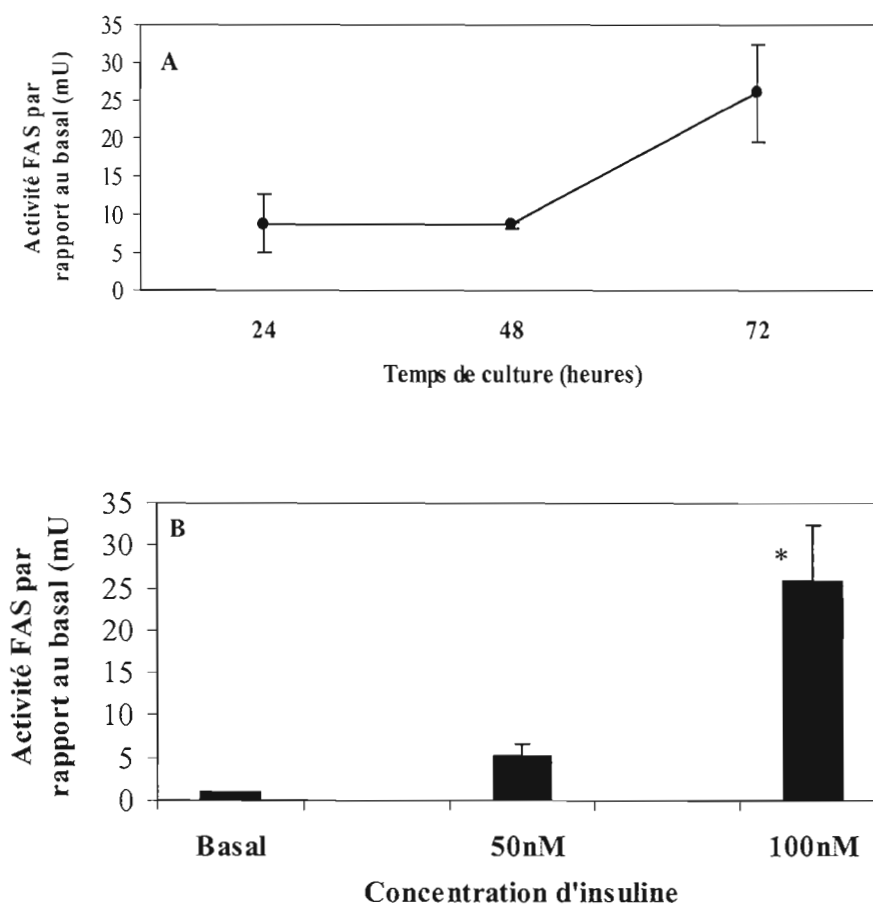
Afin de vérifier l'effet de l'insuline sur l'induction de l'activité, les concentrations d'insuline ont été réduites de moitié. Les CEH ont été stimulés pendant 72 heures à la T3 plus insuline.

Pour une durée de stimulation identique, soit 72 heures, et une concentration d'insuline de 50nM, le degré de stimulation est moindre ($5,21 \pm 1,26$) ($p>0,05$) (**figure 3.4b**). De fait, il correspond à celui observé dans une stimulation de 24 heures mais avec une concentration d'insuline de 100nM.

De plus, avec une concentration de 75 nM d'insuline, la stimulation enregistrée est comparable à celle obtenue avec 50 nM suggérant une activation maximale des voies de l'insuline à 100 nM. L'insuline a donc un effet potentialisateur sur l'action de la T3. Cette amplification peut être secondaire à une augmentation d'efficacité

transcriptionnelle d'un facteur de réponse à l'hormone thyroïdienne en présence d'insuline comme une phosphorylation du récepteur ou d'un des éléments se fixant sur le TR.

Figure 3.4 : Pattern de stimulation sur la stimulation T3 plus insuline en fonction du temps de stimulation et de la concentration d'insuline sur des CEH. A) Variation en fonction du temps de stimulation ; B) Variation en fonction de la concentration d'insuline. Les activités enzymatiques sont déterminées tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



*Signifie $p < 0.0001$ par rapport au basal et par rapport à la stimulation d'insuline de 50nM.

3.4) L'inhibition des MCFAs requiert la présence simultanée de la T3 et l'insuline.

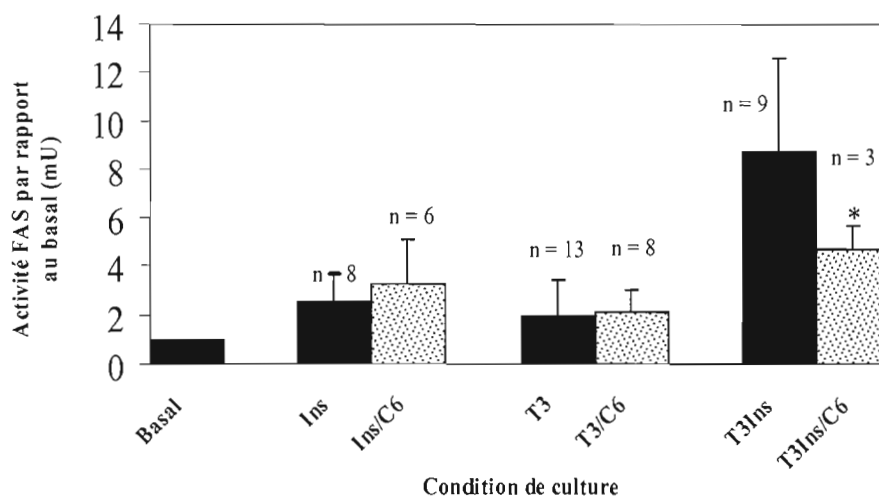
Par la suite, nous avons examiné l'effet des acides gras à chaîne moyenne (MCFA), que sont l'hexanoate et l'octanoate sur l'activité enzymatique des CEH incubés dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus. Les incubations avec les acides gras ont débuté en même temps que les stimulations. La concentration de MCFA était ajustée à 1 mM.

Les incubations effectuées avec les MCFAs ne modifient pas la quantité de protéine dans la cellule telle que déterminée selon la méthode de Bradford. Les concentrations de MCFAs utilisées ne semblent donc pas être toxiques pour la cellule.

En premier lieu, dans les conditions de stimulation à l'insuline, à la T3 ou sans aucune stimulation, aucune inhibition de l'activité enzymatique par les MCFAs n'est observée (*figure 3.5*). Pour la majeure partie des expériences avec les MCFAs, l'hexanoate a été le plus utilisé. Aussi, sauf si autrement spécifié, les valeurs obtenues se rapportent à l'hexanoate. Les activités enzymatiques observées en présence d'hexanoate sont de $3,3 \pm 1,78$; $2,12 \pm 0,92$; et $1,48 \pm 0,77$ ne démontrent pas d'inhibition comparativement aux conditions sans acides gras ($p=0,7780$, $p=0,5390$ et $0,428$) pour l'insuline, la T3 ou la condition basale respectivement. Cette absence d'inhibition suggère que l'acide gras n'est inhibiteur qu'en présence de l'insuline et de la T3. Par ailleurs, l'absence d'inhibition dans les conditions de stimulation à la T3 ou à l'insuline pourrait aussi résulter d'une absence de métabolisme actif de l'acide gras. Enfin, ce résultat peut aussi suggérer que les réponses individuelles à la T3 ou à l'insuline ne sont pas ciblées.

En second lieu, lorsque les CEH sont simultanément stimulés à la T3 et à l'insuline, l'activité enregistrée est de 4.72 ± 0.99 , soit une réduction significative de 46% ($p=0,042$) comparativement à la condition sans acides gras ($8,74 \pm 3,83$). Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'activité de la FAS par les MCFAs requiert la présence simultanée de T3 et d'insuline dans le milieu.

Figure 3.5 : Impact des acides gras à chaîne moyenne sur la stimulation hormonale de 24 heures. Les activités enzymatiques sont déterminées tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne des expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



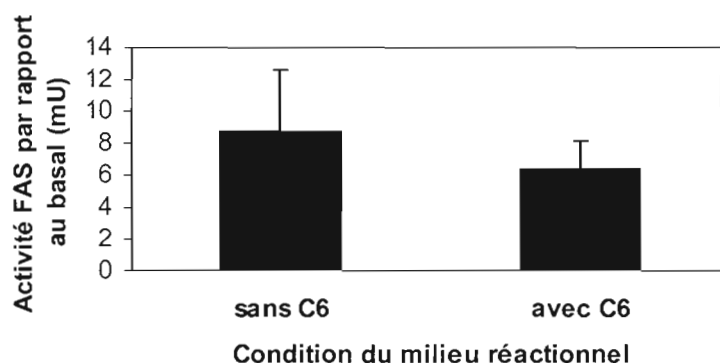
Ins=Insuline ; T3Ins=T3 plus Insuline. * Signifie $P < 0.05$ comparativement à la condition T3Ins.

3.5) Effet de l'hexanoate sur l'activité enzymatique lorsqu'il est ajouté au milieu réactionnel.

L'inhibition des MCFAs pourrait se faire directement sur l'enzyme en absence de tout effet transcriptionnel. Afin de vérifier cette possibilité, l'activité enzymatique a été évaluée en rajoutant de l'hexanoate dans le milieu réactionnel.

En rajoutant de l'hexanoate dans le milieu réactionnel à une concentration de 1 mM, l'activité enzymatique enregistrée ($6,39 \pm 1,76$) n'indique pas une réduction significative ($p=0,316$) comparativement à celle mesurée avec la stimulation T3 plus insuline ($8,74 \pm 3,83$). Ces résultats suggèrent donc que les acides gras ne modifient pas l'activité de l'enzyme et ne sont pas impliqués dans une inhibition allostérique (figure 3.6).

Figure 3.6 : Effet de l'hexanoate sur l'activité enzymatique lorsqu'il est ajouté au milieu réactionnel. Les hépatocytes sont stimulés 24 heures à la T3 plus insuline. Les extraits cellulaires et Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



3.6) Comparaison du potentiel inhibiteur de l'hexanoate et de l'octanoate .

Le potentiel inhibiteur des deux MCFAs que sont l'hexanoate et l'octanoate a été évalué sur les CEH. Tous deux ont peu d'effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la FAS dans les cellules n'ayant pas été stimulées ou celles stimulées à la T3 ou à l'insuline individuellement.

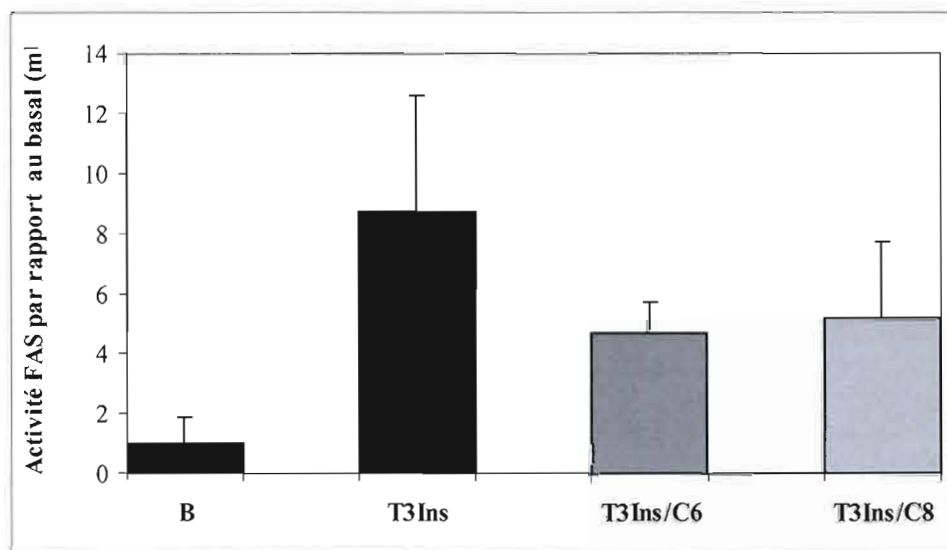
Dans les hépatocytes incubés simultanément à la T3 et à l'insuline, l'hexanoate réduit de façon significative ($p=0,0415$) l'activité de la FAS ($4,72 \pm 0,99$). Même si l'octanoate réduit l'activité de la FAS ($5,218 \pm 2,50$), le degré de significativité statistique n'est pas atteint ($p=0,0728$) (**figure 3.7**). Aussi l'hexanoate est plus efficace comme inhibiteur que l'octanoate sur l'activité enzymatique de la FAS. En l'absence d'une significativité statistique, ce degré d'inhibition peut néanmoins être d'un intérêt biologique. En effet, cette différence peut s'expliquer par un différent degré de spécificité à cause d'une différence de structure. A cet égard, l'octanoate comporte 8 atomes de carbones et l'hexanoate en comporte 6. La différence d'inhibition pourrait aussi s'expliquer par une efficacité différente de

métabolisme encore une fois due à la taille des MCFA. Ainsi, l'hexanoate et l'octanoate emprunteraient les mêmes voies métaboliques mais compte tenu de leurs tailles, l'hexanoate aurait par exemple une plus grande affinité avec les enzymes impliquées dans les voies métaboliques.

Afin de confirmer les tendances inhibitrices observées à 24 heures, des études d'inhibition ont été effectuées sur des stimulations de 72 heures. Dans ces études, les acides gras ont aussi été rajoutés 24 heures avant la détermination de l'activité enzymatique. Les cellules ont été stimulées pendant 48 heures avec la T3, l'insuline ou les deux mais sans acides gras, puis 24 heures dans les mêmes conditions mais en ajoutant les acides gras à une concentration de 1 mM.

Les études sur 72 heures révèlent les mêmes tendances inhibitrices (*figure 3.8 A*). Dans les conditions de stimulations individuelles, les activités enregistrées sont respectivement de $2,03 \pm 1,44$ et $1,65 \pm 0,07$ pour la T3 et l'insuline. L'inhibition des MCFA requiert toujours la présence simultanée des deux hormones. Pour les conditions de stimulation simultanée avec la T3 et l'insuline, dans les études de 72 heures, les activités enzymatiques enregistrées sont respectivement de $15,39 \pm 8,89$ et $13,27 \pm 8,32$ pour l'octanoate et l'hexanoate comparativement à la stimulation sans acides gras ($25,95 \pm 11,49$). Dans les études de 72 heures, le degré d'inhibition pour l'hexanoate ($p=0,0095$) et l'octanoate ($p=0,0624$) est similaire à 24 heures. Ces résultats suggèrent que l'hexanoate a un meilleur potentiel inhibiteur que l'octanoate (*figure 3.8B*).

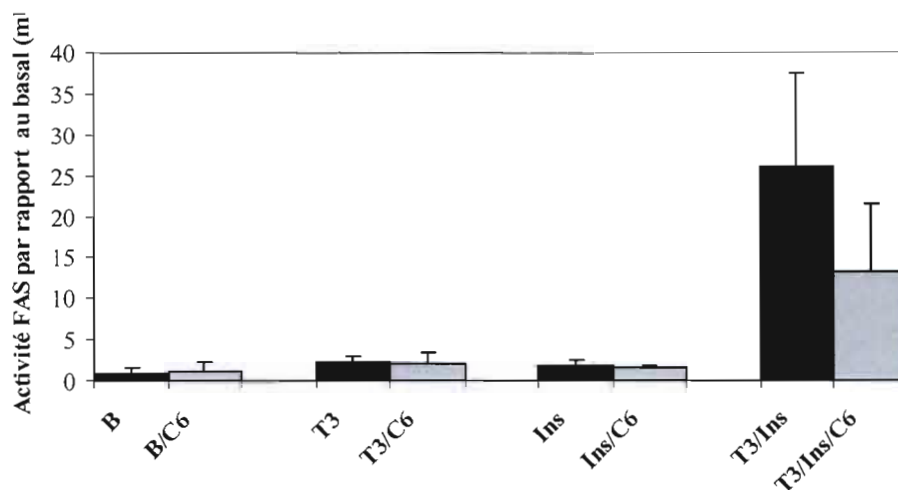
Figure 3.7: Comparaison du potentiel inhibiteur de l'hexanoate et de l'octanoate. Les hépatocytes sont stimulés 24 heures à la T3 plus insuline. L'hexanoate (C6) et l'octanoate (C8) sont ajoutés au milieu pendant 24 heures. Les extraits cellulaires et Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



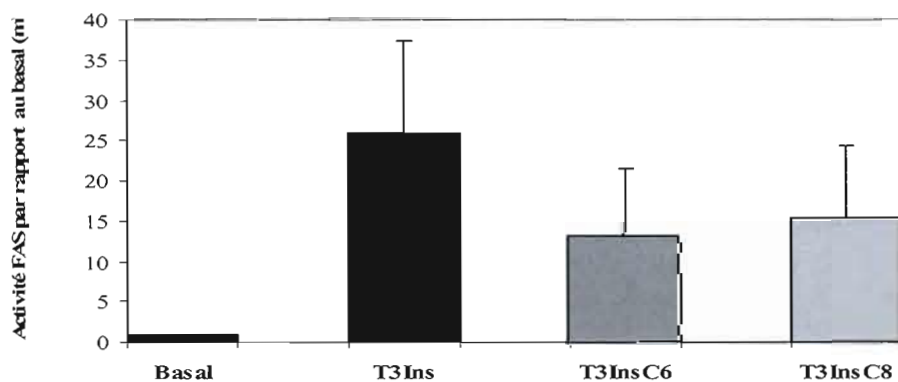
T3Ins=T3 plus Insuline. * signifie $p < 0,05$ par rapport à la condition T3Ins.

Figure 3.8 : Impact des acides gras à chaîne sur la stimulation de 72 heures à la T3, à l'insuline ou aux deux. A) Dans les différentes conditions de stimulation ; B) Potentiel inhibiteur de l'hexanoate et l'octanoate à 72 heures. L'hexanoate (C6) et l'octanoate (C8) sont ajoutés au milieu 24 heures avant la détermination de l'activité enzymatique. Les extraits cellulaires et Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne d'au moins 3 expériences \pm une déviation standard.

A



B



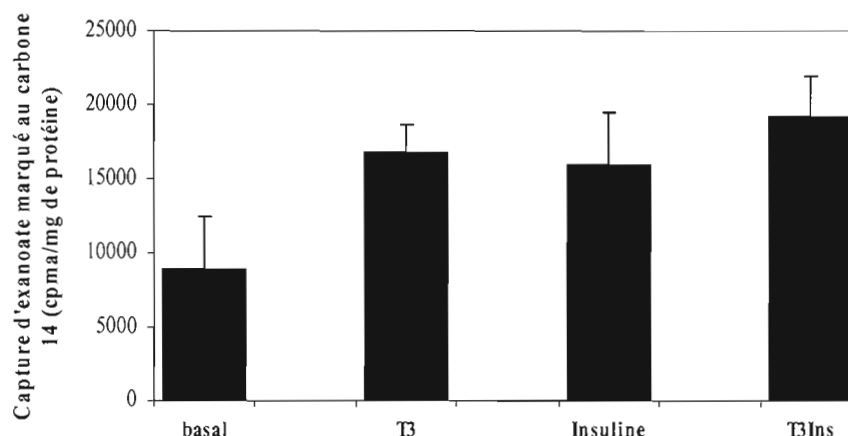
Ins= Insuline, T3Ins=T3 plus Insuline. * signifie $p < 0,05$ par rapport a la condition T3Ins.

3.7) Impact de la captation sur l'inhibition des MCFAs

Afin de déterminer si les différences d'inhibition observées dans les différentes conditions testées ne proviendraient pas d'une différence de captation de l'hexanoate par la cellule, des études de captation ont été effectuées dans des CEH après une stimulation de 24 heures à la T3, à l'insuline ou à la T3 plus insuline ou sans stimulation. Une quantité de 0.35 μ Curie d'hexanoate marqué au ^{14}C a été ajoutée par puits et l'incubation s'est poursuivie pendant 1 heure. Les études de captation sont effectuées tel que décrit dans la section matériels et méthodes.

Les quantités de radioactivité détectées dans les CEH après lavages sont 2 fois plus élevées lorsque les hormones sont ajoutées et cela quelle que soit la combinaison utilisée ($p < 0,05$). Elles sont de 8923, 16769, 16008 et 19141 cpm/mg de protéine pour le Basal, la T3, l'insuline et la T3 plus insuline, respectivement (**figure 3.9**). De ce fait, ces expériences suggèrent que la captation des acides gras est influencée par l'état hormonal. Elles suggèrent également que la captation n'est pas le facteur expliquant les différences d'inhibition. En effet, dans les conditions de stimulation à la T3, à l'insuline, ou basal, il n'y a pas d'inhibition de l'activité de la FAS. Toutefois on observe une captation accrue dans les conditions de stimulation à la T3 ou à l'insuline. La seule inhibition enzymatique observée est due à la présence des 2 hormones. Or, dans ces conditions, la captation n'est pas différente de celle observée en présence d'une seule de ces hormones. Ces résultats indiquent que l'absence d'inhibition observée en présence de T3 ou d'insuline seules n'est pas due à une absence d'hexanoate à l'intérieur de la cellule.

Figure 3.9 : Impact de la stimulation hormonale sur la captation de l'hexanoate dans les CEH. Les études de captation sont effectuées tel que décrit dans la section matériel et Methodes. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



a signifie $p < 0,05$.

3.8) Le métabolisme intracellulaire des acides gras est requis pour l'inhibition

L'inhibition de l'activité de la FAS peut être due à la forme non modifiée de l'acide gras ou au contraire dépendre du métabolisme intracellulaire. La complexification avec le bromure empêche l'utilisation des MCFAs par la cellule, que ce soit par oxydation ou par estérification. Par exemple, le 2-bromooctanoate ajouté aux hépatocytes en culture est oxydé pour obtenir son acyl-CoA correspondant et est par la suite oxydé en 2-bromo-3-ketooctanoyl-CoA. Ce dernier est un inhibiteur irréversible des 3-ketothiolases I mitochondriales et peroxisomales (Buechler et Lowenstein, 1990). Ce composé inhibe également l'activité de la diacylglycerol transférase (DGAT) (Mayorek et Bar-Tana, 1985). Ainsi en utilisant le bromohexanoate, si on observe une inhibition, alors le MCFA non modifié serait

responsable de l'inhibition. Mais si au contraire, aucune inhibition n'est observée, un métabolisme intracellulaire est probablement requis (*figure 3.10 A*).

Vingt heures après la mise en plaque, les stimulations à l'insuline, la T3 et la T3 plus insuline sont débutées sur les CEH. Les stimulations sont faites pendant 72 heures. Vingt quatre heures avant la détermination de l'activité enzymatique, les MCFAs ou leurs dérivés ont été ajoutés au milieu. Dans les CEH incubés avec le bromohexanoate, l'activité enzymatique obtenue est de 21,36 nmoles et ne diffère pas de façon significative ($p=0,204$) d'une stimulation à la T3 plus insuline (25,19 nmoles) (*figure 3.10 B*). Par conséquent, ces résultats suggèrent qu'un métabolite des MCFAs est impliqué dans l'inhibition.

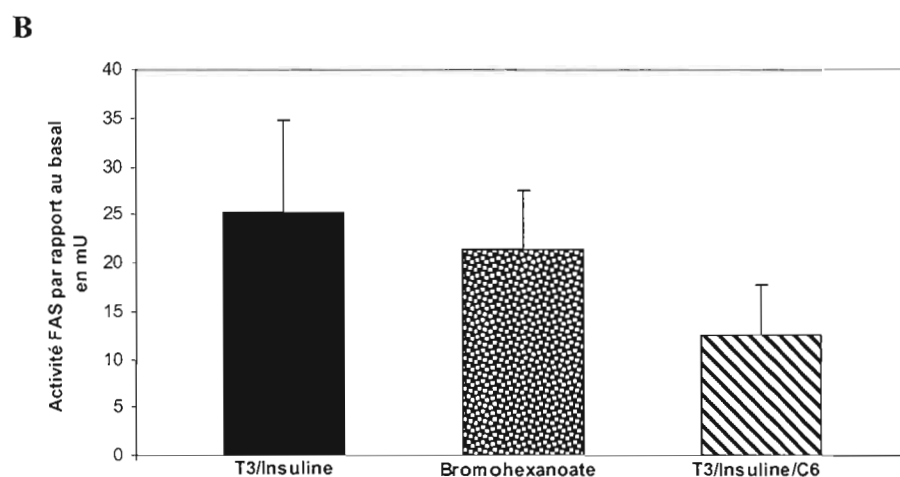
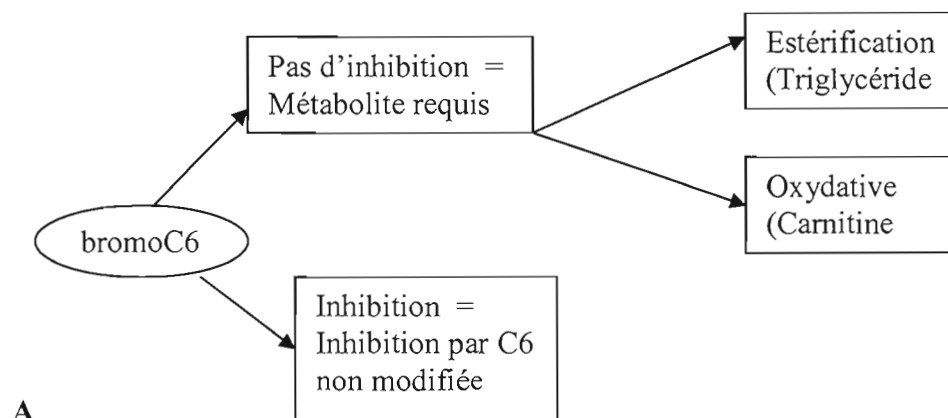
Par la suite, les voies métaboliques pouvant être empruntées par les acides gras ont été évaluées. Deux grandes voies métaboliques sont en général employées par les acides gras : soit l'incorporation dans les triglycérides ou l'oxydation dans la mitochondrie. Afin d'évaluer l'importance de chacune de ces voies dans le métabolisme, le glycérol-hexanoate (trihexanoate) et la carnitinehexanoate ont été utilisés. Le glycérol hexanoate a tout d'abord été utilisé avec de l'éthanol, et a été par la suite complexifié avec de la BSA afin que le composé soit soluble dans le milieu de culture.

En incubant les CEH avec ces composés, les valeurs des activités enzymatiques obtenues sont de 22,23mU et 17,85mU pour la glycérol hexanoate et la carnitine-hexanoate respectivement (*figure 3.11*), soit une faible réduction de l'activité ($p=0,243$ et $p=0,051$ pour la glycérol hexanoate et la carnitine-hexanoate respectivement). En l'absence d'étude de captation avec le glycérol hexanoate, on ne peut conclure sur le potentiel inhibiteur de ce composé. En effet l'absence d'inhibition pourrait s'expliquer par une captation peu efficace ou pourrait effectivement être dû à un faible potentiel inhibiteur.

De plus l'inhibition obtenue avec la canitine hexanoate n'est pas significative ($p=0,051$). Les résultats des expériences avec le bromo hexanoate suggèrent fortement que l'hexanoate doit être métabolisé mais ceux obtenus avec la glycérol hexanoate et la carnitine-hexanoate ne permettent de privilégier aucune des voies. Des études complémentaires sont nécessaires afin de caractériser ce métabolite par exemple en utilisant des inhibiteurs spécifiques de la β -oxydation et un inhibiteur de la formation des triglycérides.

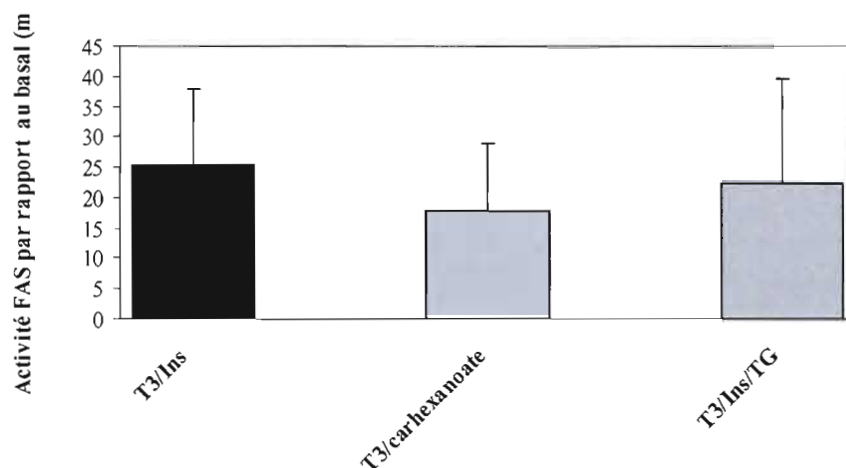
Figure 3.10 : Impact de la bromo-hexanoate sur les activités enzymatiques de la FAS enregistrées dans les CEH. A : Démarche expérimentale B) Activité enzymatique avec les différents métabolites.

Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



BromoC6 = Bromohexanoate ; Carnitine C6 = Carnitine hexanoate.

Figure 3.11 : Activités enzymatiques FAS enregistrées en présence des métabolites. Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



3.9) Effet des MCFAs sur les stimulations séquentielles

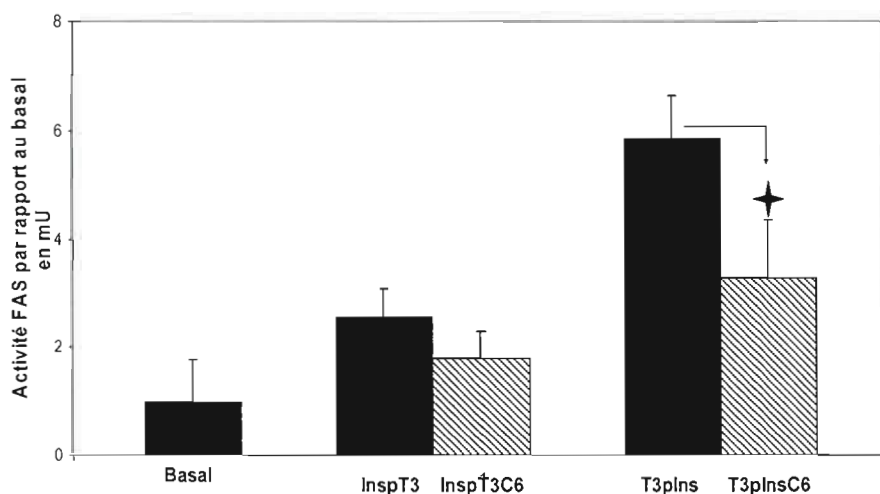
Les analyses du profil lipidique révèlent que l'insuline est nécessaire dans le métabolisme des acides gras

Des études d'inhibition ont été également effectuées sur les stimulations séquentielles tel que décrit dans la première section. Les MCFAs étaient présent dans le milieu durant toute la durée de l'incubation à une concentration de 1mM.

Dans la condition de stimulation InspT3 (*figure 3.12*), les activités observées $1,78 \pm 0,59$ en présence d'acides gras ne montrent pas d'inhibition comparativement aux valeurs sans acides gras ($2,55 \pm 0,50$) ($p=0,496$). Cependant dans la condition de stimulation T3pIns, on note une réduction d'activité en présence d'acide gras ($3,26 \pm 1,07$) comparativement à la condition sans acides gras ($5,84 \pm 0,81$). Cette inhibition atteint le même degré d'inhibition (42%) que dans les conditions de stimulation simultanée. L'inhibition du métabolisme étant fortement dépendante de

la présence de l'insuline et la T3 n'étant pas présente en même temps que l'insuline, il est aussi possible d'envisager que l'inhibition par les MCFAs puisse se faire sur le facteur induit par la T3

Figure 3.12 : Impact des MCFAs sur activités enzymatiques FAS suite à des stimulations séquentielles de 24 heures sur des CEH Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



InspT3=insuline puis T3 ; T3pIns = T3 puis insuline. ♦ signifie $p < 0,05$ par rapport à T3pIns.

3.10) Impact de la stimulation hormonale sur le métabolisme des MCFAs.

Afin de tenter d'identifier le métabolite responsable de l'inhibition de la FAS, nous avons évalué la modification de l'acide gras utilisée une fois rentrée dans la cellule. Pour cela, le profil lipidique a été réalisé dans les différentes conditions de stimulations tel que décrit dans la première section. Les incubations aux MCFAs marqués au ^{14}C ont débuté au même moment que les stimulations. Les MCFAs

marqués ont été ajoutés au milieu à raison de 2 μ curies par plaque de 6 puits. Vingt quatre heures après le début de l'incubation, les lipides ont été extraits et la séparation a été effectuée sur gel de silice tel que décrit dans la section matériels et méthodes.

Pour chaque condition, 5 fractions correspondant aux phospholipides, au cholestérol libre, aux diacylglycérols, aux triglycérides et aux esters de cholestérol ont été identifiées. Par la suite, les incorporations d'isotope marqué ont été évaluées dans chaque fraction par analyse au compteur gamma (*figure 3.13a*). Les décomptes révèlent une grande incorporation d'isotope dans deux fractions : les triglycérides et les esters de cholestérol, l'incorporation au niveau des triglycérides étant majeure. Dans les autres fractions, l'incorporation est faible et varie peu quelle que soit la condition de stimulation.

En analysant selon les conditions de stimulation, on remarque que l'insuline est très impliquée dans le métabolisme des MCFAs tandis que la T3 l'est peu. En effet, le degré d'incorporation de radioactivité dans les différentes fractions est identique que ce soit dans la condition de stimulation à la T3 ou dans le basal. Toutefois, en présence simultanée d'insuline et de T3, l'incorporation de radioactivité au niveau des triglycérides est de 2,5 fois plus importante que celle du basal ($p=0,0012$). Un même degré d'incorporation est observé dans la condition de stimulation à l'insuline seule ($p=0,033$). Par ailleurs, l'incorporation de radioactivité dans les esters de cholestérol est de 1,6 fois celle du basal, autant dans la condition de stimulation à la T3 plus insuline ($p=0,0138$). Cependant dans la condition de stimulation à l'insuline seule le degré de significativité n'est pas atteint ($p=0,068$).

En terme de pourcentage par rapport au total des formes métabolisées, l'incorporation dans les triglycérides est de 68% dans les CEH stimulés à la T3 plus insuline. En ce qui concerne les esters de cholestérol, elle est de 16% dans les CEH stimulés à la T3 plus insuline (*figure 3.13b*).

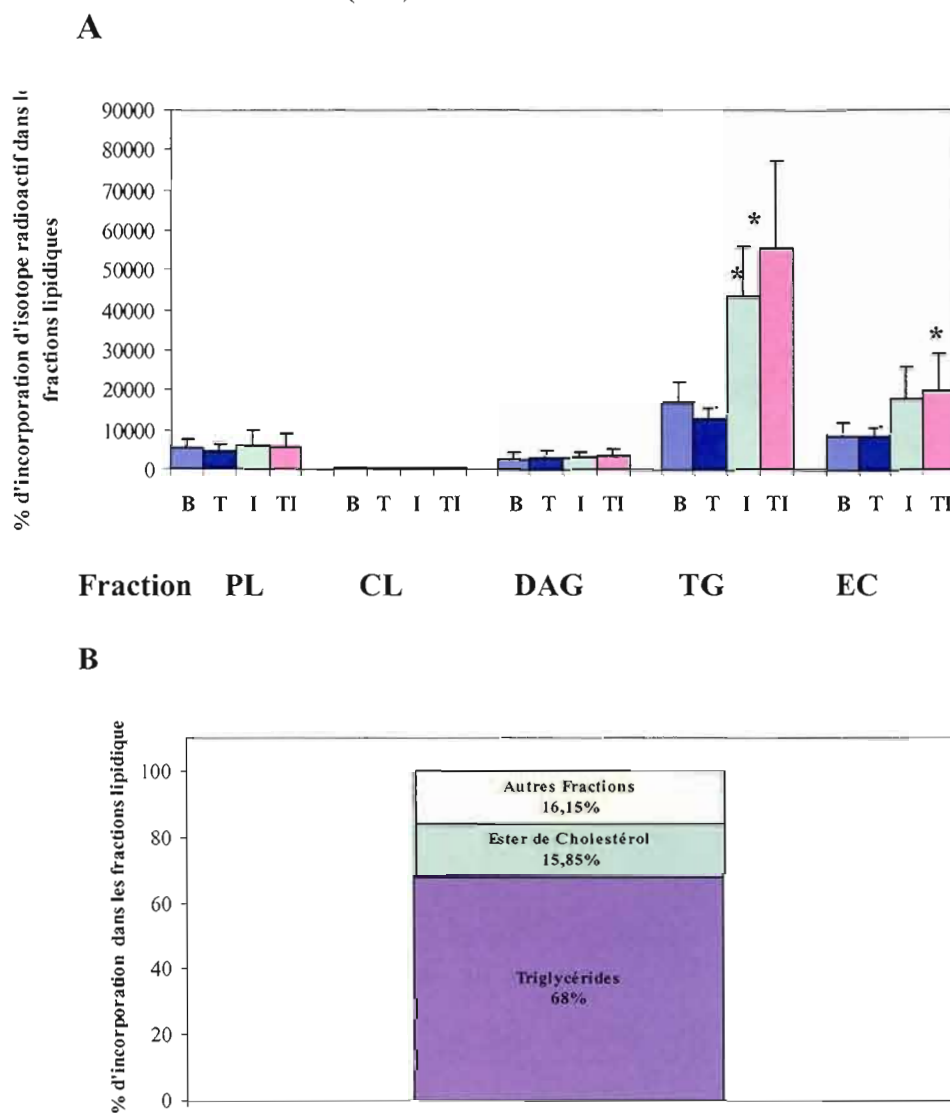
Ces résultats suggèrent que le métabolisme des MCFAs dépend fortement d'une régulation par l'insuline et que la plupart de l'hexanoate qui entre dans la cellule est

métabolisé en triglycérides nous permettant de supposer que cette forme pourrait être responsable de l'action des MCFAs.

En corrélation avec ces résultats, dans les stimulations de 72 heures, lorsqu'on diminue les concentrations d'insuline, on perd une très grande partie de l'effet inhibiteur avec les acides gras (*figure 3.14*). L'activité enzymatique enregistrée est de $4,45 \pm 1,34$, soit une réduction de 15% comparativement à la condition sans acides gras ($5,21 \pm 1,26$). Ainsi à une concentration d'insuline de 50nM, on n'observe pas d'inhibition tandis qu'à une concentration de 100nM, il y a une inhibition. Cela renforce bien nos observations comme quoi l'insuline est donc très impliquée dans le métabolisme des lipides.

Toutefois même si l'insuline est impliquée dans le métabolisme, on n'observe pas d'action inhibitrice dans les CEH incubés en présence de cette seule hormone. Cependant dans les conditions de stimulation à la T3 plus insuline, il y a inhibition. Aussi peut-on supposer que même si l'insuline est impliquée dans le métabolisme, l'inhibition est sur la réponse de la T3. L'insuline serait nécessaire à la formation du métabolite et ce métabolite agirait sur la réponse à la T3. Il pourrait donc y avoir plusieurs niveaux d'action de l'insuline pour moduler la réponse à la T3.

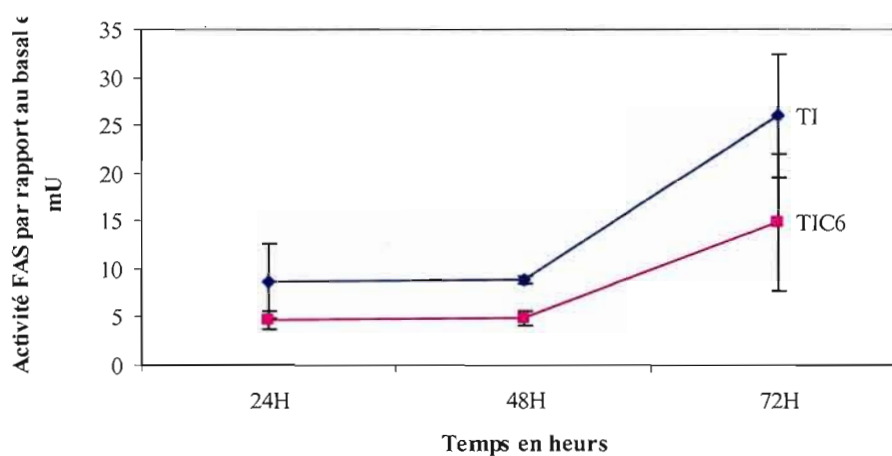
Figure 3.13: Profil lipidique obtenue dans les CEH stimulés pendant 24 heures en présence d'hexanoate. A) Incorporation des MCFAs dans les différentes fractions lipidiques. B) Pourcentage d'incorporation dans les fractions lipidiques dans la stimulation à la T3 plus insuline. Le profil lipidique a été établi tel que décrit dans matériels et méthodes. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



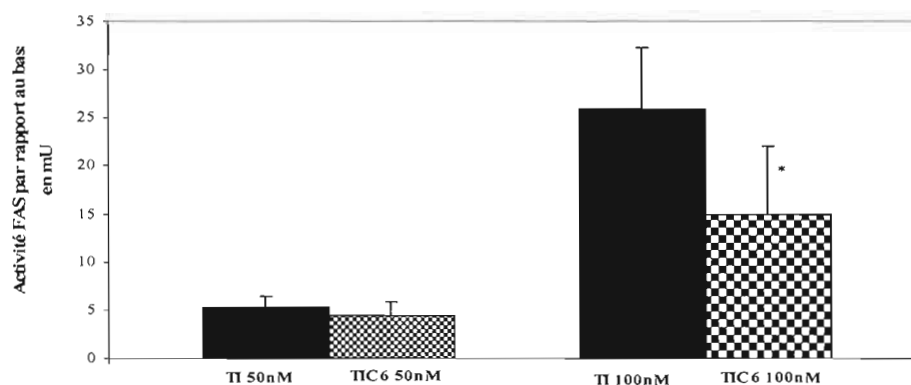
PL : Phospholipides, CL : Cholestérol libre, DAG : Diacylglycérols, TG : Triglycérides, Ec : Esters de cholestérol. B= basal ; T=T3 ; I= Insuline ; TI= T3 plus insuline. * signifie que $p < 0,05$.

Figure 3.14 : Impact de la variation de temps et la concentration d'insuline sur l'effet des MCFAs dans les CEH stimulés à la T3 plus insuline. A) En fonction du temps B) En fonction de la concentration d'insuline. Les activités enzymatiques sont obtenus tels que décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs rapportées enregistrées représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).

A



B



TI = T3 plus insuline, TI C6 = T3 plus insuline plus hexanoate (C6), *signifie $p < 0,05$ comparativement à la condition sans C6.

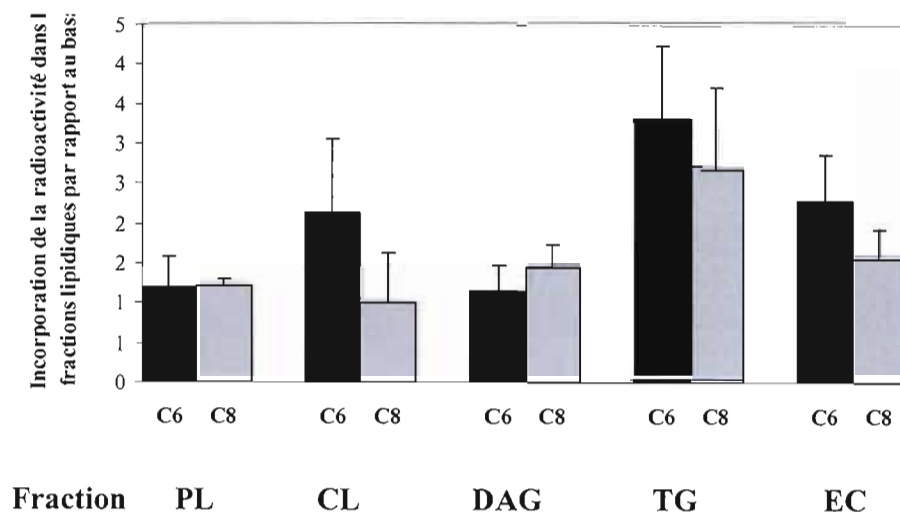
3.11) Impact du type d'acide gras sur l'incorporation dans les différentes fractions lipidiques

Afin de vérifier l'impact du métabolisme de la C6 ou C8 sur l'inhibition, le profil lipidique a été déterminé dans les CEH selon les mêmes conditions que celles décrites ci haut. Le profil lipidique déterminé dans les deux cas est identique.

Avec l'octanoate, la migration sur gel, révèle encore une fois de plus les cinq bandes tels qu'observées dans les incubations avec l'hexanoate. Les quantifications de radioactivité dans chacune de ces bandes révèlent les mêmes variations d'incorporations (*figure 3.15*). Avec le profil lipidique établi pour l'hexanoate, la T3 influait peu sur le métabolisme des lipides. Le profil dans la condition de stimulation à l'insuline était similaire à celui de la T3 plus insuline. Aussi, pour comparer les profils lipidiques entre l'hexanoate et l'octanoate, seuls les conditions basale et de stimulation à la T3 plus insuline ont été utilisées. Dans les CEH stimulées à la T3 plus insuline et incubés avec la C6 ou la C8, les incorporations d'isotope radioactif sont identiques (68% et 65%) dans les triglycérides et 16% dans les esters de cholestérol.

Dans les incubations avec l'octanoate, comparativement au basal, l'incorporation relative de radioactivité dans les fractions correspondantes aux phospholipides, cholestérol libre, diacylglycérol, triglycérides et esters de cholestérol sont respectivement de $1,21 \pm 0,08$, $1 \pm 0,62$; $1,44 \pm 0,29$; $2,68 \pm 1,02$ et $1,56 \pm 0,37$. Dans les incubations avec l'hexanoate, ces valeurs sont de $1,20 \pm 0,38$; $2,15 \pm 0,91$; $1,15 \pm 0,32$; $3,32 \pm 0,93$; $2,29 \pm 0,58$ pour les mêmes fractions. Il n'y a pas moins d'incorporation de radioactivité dans les fractions lipidiques de triglycérides, cholestérol libre et ester de cholestérol avec des significativités statistiques limites pour le cholestérol libre ($p = 0,052$) et les esters de cholestérol ($p = 0,051$). Ces résultats suggèrent donc que les voies métaboliques empruntées par les deux acides gras sont semblables. Il se peut donc que la différence d'inhibition résulte de la spécificité du métabolite.

Figure 3.15 : Comparaison de l'incorporation relative de l'hexanoate et l'octanoate radioactif dans les différentes fractions lipidiques entre dans des CEH. Le profil lipidique pour l'hexanoate et l'octanoate sont déterminés tel que décrit dans matériel et méthodes. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences \pm une déviation standard ($n=3$).



PL = phospholipides; CL = cholestérol libre; DAG = Diacylglycérole, TG = Triglycérides; EC = Esters de cholestérol.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

4.1 DISCUSSION

L'acide gras synthase (FAS) est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* des lipides. Son inhibition représente une approche intéressante dans la réduction de la lipogenèse. La quantité de FAS exprimée ainsi que son activité au niveau hépatique varie selon l'état nutritionnel. Les hormones telles que la T3 et l'insuline ont un effet inducteur, alors que les acides gras à chaîne moyenne (MCFAs) contenus dans la diète inhibent l'activité de la FAS (Roncero et Goodridge, 1992). Cependant leur mécanisme d'action est encore inconnu. Des études orientent vers une action au niveau du complexe T3-TR-T3RE (Thurmond *et al.*, 1998). L'étude des mécanismes d'inhibition par les MCFAs serait plus aisée si on connaissait le(s) métabolite(s) impliqué(s). Il(s) est/sont toutefois inconnu(s). Dans la présente étude, nous tentons de caractériser l'inhibition de l'activité de la FAS par les MCFAs. La méthode d'étude utilisée est la mesure d'activité enzymatique dans des hépatocytes de poulet en culture primaire.

Dans des hépatocytes d'embryon de poulet de 19 jours (CEH), des stimulations aux hormones et aussi aux acides gras ont été effectuées. L'effet de ces différentes manipulations a été mesuré par les calculs d'activité enzymatique.

Les résultats de la présente étude montrent que, dans les CEH de 19 jours, le traitement hormonal à la T3 et/ou l'insuline stimule l'activité enzymatique de la FAS. Dans les stimulations de 24 heures, l'insuline et la T3 utilisés seuls ont un faible potentiel inducteur induisant une activité de 2-3 fois. On observe les mêmes tendances lorsque les stimulations sont effectuées pendant 72 heures. Cependant, utilisées simultanément, ces hormones ont un effet synergique entraînant une augmentation de l'activité de 8 fois (**Figure 3.1**).

De plus, la réponse des CEH aux stimulations à l'insuline indique que l'intégrité des cellules n'est pas affectée lors de l'isolation des hépatocytes avec la collagénase. La réponse à la stimulation à l'insuline, une réponse qui dépend de l'intégrité de la membrane, n'est pas réduite comparativement à celles que rapporte la littérature (Wilson *et al.*, 1986). En effet, on a toujours le même degré de stimulation de 2 à 3 fois.

L'activité enzymatique a été corrélée avec les quantifications d'ARNm dans des conditions de stimulation identiques. Les quantifications d'ARNm FAS effectuées dans le laboratoire du Dr Mounier par une autre étudiante (**Rapport de stage, Pomme Boissier 2005**) montrent des variations similaires suggérant une régulation transcriptionnelle du gène FAS. Les mêmes tendances ont été notées au niveau de la transcription (**Mémoire de Maîtrise Caroline Martel**). Les résultats des travaux de Susan et ses collaborateurs (1990) montrent les mêmes variations d'activité en fonction des stimulations hormonales.

Ensemble, ces travaux permettent d'établir la validité de la méthodologie enzymatique utilisée.

L'effet synergique observé entre la T3 et l'insuline suggère une interaction entre les voies de la T3 et de l'insuline, ceux-ci pouvant agir de façon indépendante ou par l'intermédiaire d'un facteur commun. Les études avec les stimulations séquentielles

(*Figure 3.2*) à l'insuline puis à la T3 suggèrent que la stimulation par l'insuline est limitée dans le temps. La stimulation à la T3 n'a pas d'impact sur la stimulation à l'insuline puisque la présence séquentielle induit des niveaux d'activité comparables aux stimulations individuelles aux hormones. L'effet synergique induit en présence de l'insuline n'est probablement donc pas dû à l'induction de facteur de transcription qui agirait comme médiateurs de l'effet de l'insuline. Lorsque les CEH sont tout d'abord stimulés à la T3 puis à l'insuline, l'effet synergique est présent. L'insuline potentialise donc l'effet de la T3. Ceci pourrait être fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription dont SREBP, Sp1 et NFY (Magana *et al.*, 2000; Horton *et al.*, 2002) et par l'intermédiaire de cascades de phosphorylation impliquant la PI3-K et AKT (Sul *et al.*, 2000). En effet, l'activité de SREBP semble être augmentée par la phosphorylation sur les résidus sérine/thréonine suite à une stimulation de l'insuline (Kotzka *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2000). Cependant, étant donné qu'il est peu probable que l'induction de facteurs de transcription soit majoritairement impliqué et que l'effet de l'insuline soit limité dans le temps, il est envisageable que le facteur modulateur dans cet effet synergique soit la phosphorylation. Des travaux antérieurs ont d'ailleurs montré que l'état de phosphorylation des cellules influence l'induction de gènes ciblés par la T3 (Jones *et al.*, 1994). Les inhibiteurs de kinase inhibent l'activité alors que les inhibiteurs de phosphatase augmentent l'effet de la T3.

Nous avons nous aussi réalisé des études avec les inhibiteurs de sérine/ thréonine et des inhibiteurs de tyrosine kinase (*Figure 3.3*). Les résultats obtenus suggèrent l'existence de voies de signalisation impliquant une ou des sérine/thréonine kinase dans la régulation de la FAS; cette inhibition se faisant au niveau de la transcription (*Mémoire de Maîtrise de Anne Radenne*). Swierczynski et ses collègues avaient également noté que l'inhibition par les protéines kinases réduisait l'accumulation d'ARNm de l'enzyme malique et de la FAS (Swierczynski *et al.*, 1991). Les mécanismes moléculaires et les kinases impliqués dans l'augmentation de l'efficacité de la transcription induite par la T3 par la phosphorylation ne sont pas connus. Cette phosphorylation pourrait agir sur des facteurs de transcription tels que les SREBPs

(Kotzka *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2000) ou sur le récepteur lui-même (Jones *et al.*, 1994). Dans cette expérience, l'utilisation de la H7, une isoquinoline sulfonamide, réduisait l'induction par l'insuline et la T3 indiquant que le(s) sérines/threonine(s) kinases impliquée(s) pouvaient être activée(s) par l'induction par l'insuline ou par la T3 indépendamment. Il est donc possible que la liaison de la T3 à son ligand stimule ou favorise la phosphorylation du TR par la kinase. Un cas similaire avait été observé dans les fibroblastes humains où la liaison de la T3 avec son récepteur entraînait l'activation de mTOR via la voie de signalisation PI3-AKT (Xia *et al.*, 2005). Ces phosphorylations T3-dépendantes étaient bloquées par des inhibiteurs de PI3-kinase ou par l'expression de dominants négatifs PI3-kinase. En utilisant un TR dominant négatif (G345R), on perdait la phosphorylation avec mTOR. Ceci indique que le TR est lui-même impliqué. Suivant ce modèle, la T3 et l'insuline pourraient agir sur l'état de phosphorylation en jouant sur la/les voie(s) de signalisation activant une ou des sérine/threonine (s). Le 'end point' de cette phosphorylation sur le promoteur du gène n'est pas connu. Il est fort probable qu'il pourrait que ce soit sur les facteurs de transcription mais l'effet majeur impliquerait le récepteur lié à son ligand. L'identification de sites de phosphorylation sur le récepteur ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques serait nécessaire à la caractérisation de ces phénomènes de phosphorylation. Cette étude est actuellement en cours au laboratoire.

En général, les acides gras à longue ou moyenne chaîne, saturés ou non saturés, contenus dans la diète ont un effet inhibiteur sur la lipogenèse (Hillgartner *et al.*, 1995). Cependant, les mécanismes d'action postulés et les régions ciblées par ces acides gras sont différents.

Les acides gras à chaîne moyenne (MCFAs) contenus dans la diète inhibent l'activité de la FAS (Roncero et Goodridge, 1992). Les MCFAs ont un effet inhibiteur réversible, spécifique, et sélectif pour les gènes lipogéniques (Roncero et Goodridge, 1992). Toutes ces caractéristiques leur confèrent un rôle physiologique important dans la régulation de la synthèse des lipides. Le but de la présente étude était de

caractériser cette inhibition en utilisant la méthode enzymatique et les analyses de profil lipidique sur des CEH stimulés. Les inhibitions par les MCFAs ont été évaluées sur chaque condition de stimulation soit l'insuline et la T3.

En utilisant les mesures d'activité enzymatique sur des CEH stimulés avec l'insuline, la T3 ou la T3 plus l'insuline et en ajoutant des MCFAs au milieu, on constate que l'inhibition avait essentiellement lieu en présence simultanée de T3 et d'insuline (**Figure 3.5**). Aucune inhibition n'avait été observée sur la condition sans stimulation indiquant que l'inhibition nécessitait soit un métabolisme du MCFA ou dépendait d'une réponse induite par les hormones. Sur les conditions de stimulation individuelles, insuline ou T3, aucun effet inhibiteur n'a été observé. Dans les conditions de stimulation simultanée à la T3 et à l'insuline, on observe une réduction de l'activité enzymatique de la FAS de 50%. Cette réduction d'activité n'est pas la résultante d'une interaction allostérique de l'acide gras avec l'enzyme car, en ajoutant les acides gras dans le milieu pendant l'essai enzymatique, on n'observe pas une réduction d'activité (**Figure 3.6**). Des quantifications d'ARNm ont été faites au laboratoire et indiquaient aussi une réduction des ARNm dans les conditions de stimulation à la T3 plus insuline. Dans ce cas aussi, aucune réduction n'avait été observée dans les conditions de stimulation individuelles. Les variations en parallèle de l'activité enzymatique et des quantifications d'ARNm suggèrent que les acides gras agissent au niveau de la transcription. Ceci est en accord avec les travaux menées sur la réduction de l'activité de la FAS par les MCFAs (Roncero et Goodridge, 1992 ; Thurmond *et al.*, 1998).

Les quantifications de la protéine FAS n'ont pu être effectuées par manque d'anticorps primaires adéquats. Elles auraient permis de confirmer que les MCFAs ont un effet sur la quantité de protéines produites. Notre hypothèse étant que la quantité de protéine exprimée est corrélée à l'activité enzymatique mesurée car l'effet des MCFAs est probablement transcriptionnel.

Les études d'activité enzymatique en réduisant les quantités d'insuline de moitié suggèrent que l'insuline est très importante pour l'induction tel qu'il a été mentionné ci haut (**Figure 3.4**). Toutefois, elles suggèrent aussi que l'insuline est très importante dans l'inhibition médiée par les MCFAs jouant peut être un rôle dans la phosphorylation (**Figure 3.12**).

Dans les études présentées ici, deux MCFAs, l'hexanoate et l'octanoate ont été utilisés. L'hexanoate avait un meilleur potentiel inhibiteur que l'octanoate (**figures 3.7 et 3.8**). Les études de profil lipidique ont cependant révélé que l'hexanoate et l'octanoate étaient transformés de façon similaires par la cellule (**Figure 3.15**). Cette différence pouvant être secondaire à une différence de spécificité du métabolite. Si l'on se fie aux études réalisées par Roncero et Goodridge (1992), les concentrations d'acides gras influeraient sur les degrés d'inhibition (**Annexe A**). Jusqu'à une concentration de 2.0 mM, l'hexanoate serait plus efficace comme inhibiteur. Au-delà de cette concentration, l'octanoate devenait plus inhibiteur. De plus, à partir de 1 mM, le degré d'inhibition avec l'hexanoate demeurerait stable. Cette observation favoriserait donc l'hypothèse d'une plus grande efficacité et d'un plus rapide métabolisme de l'hexanoate par rapport à l'octanoate. (**figure 3.15**). Donc, afin de caractériser l'inhibiteur de la FAS, l'hexanoate a été utilisé pour le reste des expériences.

Les études de captation (**Figure 3.9**) montrent que l'état hormonal de la cellule influe sur la captation. La présence de T3, d'insuline ou de T3 plus insuline induisent une captation égale. Cependant, on observe un effet inhibiteur seulement avec la T3 et l'insuline.

La présence d'une augmentation de captation d'hexanoate lors de l'addition des hormones suggère que les MCFAs seraient transportés dans la cellule par un mécanisme actif tout comme celui décrit pour les acides gras à longue chaîne (Abumrad *et al.*, 1998).

Les analyses des études de profil lipidique, les études de captation, conjointement avec les analyses des activités enzymatiques suggèrent que la réponse à la T3 est celle qui est ciblée par les MCFAs et que l'insuline serait impliquée dans le métabolisme. Les études portant sur l'inhibition de l'activité par les MCFAs réalisées par Thurmond et ses collaborateurs (1998) suggèrent également que la réponse à la T3 était ciblée par les MCFAs.

Dans les stimulations séquentielles en présence d'acides gras (*figure 3.12*), l'absence d'inhibition dans la condition insuline puis T3 et la présence d'inhibition dans la condition de stimulation à la T3 puis insuline suggèrent que même si l'insuline est requis pour le métabolisme de l'acide gras, la réponse à la T3 est celle qui est ciblée. De plus, l'inhibition en présence de T3 et insuline semble indiquer que l'inhibition par les MCFAs requiert la présence de la réponse de l'insuline ou antagoniserait la phosphorylation induite par l'insuline sur le récepteur à la T3, cela restant toutefois à vérifier. Cette hypothèse serait en accord avec l'inhibition de la transactivation du récepteur notée par Thurmond et ses collaborateurs (1998). L'inhibition pourrait se faire suite à l'acétylation du récepteur à la T3 comme suggéré par des études par Massillon et ses collaborateurs (2003). Dans leurs études sur le gène de la glucose-6 phosphatase, Massillon et ses collaborateurs (2003) avaient noté que les acides gras à chaîne courte ont un effet stimulateur sur l'activité du promoteur. Cette stimulation semblait liée à des phénomènes d'acétylation. En effet, dans leur système de culture, en utilisant la trichostatine, un inhibiteur de l'histone déacétylase, ils observaient toujours un effet synergique sur l'activité du promoteur HNF-4 α en présence des acides gras à chaîne courte (Massillon *et al.*, 2003). Ceci confirmerait l'impact potentiel des acides gras sur les phénomènes d'acétylation. Il pourrait y avoir une action par l'intermédiaire du co-facteur CBP-p300 qui est une acétylase et qui serait activé par les acides gras. Dans le cas de la FAS, l'activation de la CBP-p300 pourrait réduire l'activité du TR en augmentant son état d'acétylation. Cette hypothèse reste toutefois à être vérifiée.

Dans la caractérisation du métabolite, aucun métabolite n'a été identifié avec certitude pour le moment mais des premiers résultats nous orientent vers des avenues futures. Le bromohexanoate a été utilisé dans un premier temps pour déterminer si un métabolite était requis ou si l'inhibition était médiée par l'acide gras lui-même, non modifié (*figure 3.10*). La complexification avec le bromure empêche l'utilisation des MCFAs par la cellule, que ce soit par oxydation ou par estérification. Par exemple, le 2-bromooctanoate ajouté aux hépatocytes en culture est oxydé pour obtenir son acyl-CoA correspondant et est par la suite oxydé en 2-bromo-3-ketooctanoyl-coA. Ce dernier est un inhibiteur irréversible des 3-ketothiolases I mitochondriales impliqués dans la chaîne mitochondriale (Buechler et Lowenstein, 1990). Son inhibition empêche la progression de l'oxydation de l'acide gras. De par sa position en amont, elle bloquerait toute oxydation des acides gras. Ce composé inhibe également l'activité de la diacylglycerol transférase (DGAT) (Mayorek et Bartana, 1985). Cette enzyme catalyse la formation de triglycérides en ajoutant un acide gras acylé à une molécule de diacylglycérol. Ainsi, en utilisant le bromohexanoate, si on observe une inhibition, alors le MCFA non modifié serait responsable de l'inhibition. Mais si, au contraire, aucune inhibition n'est observée, un métabolisme intracellulaire est probablement requis. Les résultats obtenus avec le bromohexanoate qui n'inhibe pas l'activité de la FAS indiquent que le métabolisme de l'acide gras est requis.

Par la suite, différents acides gras modifiés ont été utilisés afin de déterminer la voie pouvant être empruntée par les MCFAs (*figure 3.11*). Lorsque des acides gras entrent dans la cellule, ils peuvent être métabolisés suivant 2 voies : celle de l'estérification pour former des triglycérides et celle de l'oxydation où l'acide gras doit être associé à la carnitine par la carnitine hexanoate. Dans l'oxydation des acides gras, la carnitine est importante pour le transport des acides gras à longue chaîne à travers la membrane mitochondriale, site principal d'oxydation des acides gras. Le transport des acides gras à travers la membrane peut se faire indépendamment de ce composé (Williamson *et al.*, 1968). Toutefois, 10 à 20% du transport de l'octanoate à

travers la mitochondrie serait dépendant de ce système (Otto, 1984 ; Zammit, 1980). Nous avons donc utilisé la carnitine-hexanoate et les trihexanoates pour identifier la voie préférentiellement utilisée par les acides gras.

Les résultats obtenus (*figure 3.11*) ne nous ont pas permis d'identifier une voie probable. En effet, l'utilisation la carnitine hexanoate n'indique pas une inhibition significative de l'activité de la FAS tandis que celles avec les triglycérides n'indiquent pas d'inhibition du tout. Il est à noter que, pendant les incubations, il a été difficile de solubiliser la forme triglycéride des acides gras. Il existe donc un doute quant à sa capture par la cellule. En l'absence de mesure de captation de ces triglycérides, on ne peut conclure sur une absence d'inhibition. En effet, il est possible que le manque d'inhibition soit dû à une faible capture de l'acide gras sous cette forme. Des études avec des inhibiteurs spécifiques de voies métaboliques de la β -oxydation ou de l'estérification pourraient être par la suite réalisées. Ceci serait en effet nécessaire afin de mieux caractériser les voies empruntées par les acides gras.

Afin aussi de pouvoir nous orienter dans l'identification du métabolite impliqué dans l'inhibition de la FAS, nous avons voulu analyser le profil lipidique de la cellule après incubation avec différentes hormones en présence d'hexanoate radioactif. Les résultats obtenus en effectuant les profils lipidiques dans les cellules indiquent quant à eux, une forte incorporation de l'hexanoate marqué au C^{14} dans la fraction des triglycérides. En considérant les pourcentages d'incorporation par rapport au total de toutes les fractions métabolisées, elle atteint 68% démontrant que la majorité de l'hexanoate ajouté est transformés en triglycérides. Dans les études de profil lipidique, l'autre fraction dont le taux d'incorporation est marqué est celle des esters de cholestérol, l'incorporation par rapport à toutes les fractions métabolisées étant de 16%. Ces incorporations sont obtenues dans les conditions de stimulation à la T3 plus insuline ou l'insuline seule. Par contre dans les profils lipidiques avec la T3 seule, il n'y avait pas de métabolisme majeur observé. Ceci confirme l'importance du métabolisme cellulaire de la régulation de l'insuline. De fait, ces résultats sont en accord avec l'effet stimulateur de l'insuline dans le métabolisme des triglycérides.

En effet, il a été montré que l'insuline stimulerait fortement la synthèse des triglycérides (Murray *et al.*, 1995).

Cependant, les acides gras utilisés sous forme de triglycérides (*figure 3.11*) ne montrent pas d'inhibition sur l'activité enzymatique, probablement, par manque de capture. En effet, les triacylglycérols ne sont pas captés par le foie. Ils sont métabolisés par les tissus extra-hépatiques qui possèdent la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme qui hydrolyse les triacylglycérols (Murray *et al.*, 1995). Le degré de captation des triglycérides est proportionnel à l'activité de la LPL. Elle est présente sur la paroi endothéliale des vaisseaux irriguant le muscle, site d'oxydation et le tissu adipeux, site de stockage des acides gras. Son activité est augmentée dans le muscle en période de jeûn et dans le tissu adipeux en période post-prandiale (Robinson *et al.*, 1975). L'hydrolyse des triacylglycérols par la lipoprotéine lipase semble être un pré-requis pour l'absorption des acides gras.

Il est aussi possible, dans le cas où les triglycérides sont inhibiteurs, que leur production soit obligatoirement intracellulaire ce qui serait probablement le cas.

Enfin, il est aussi possible que les MCFAs sous forme estérifiée ne soient pas inhibiteurs. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer le potentiel inhibiteur des triglycérides.

Des études de profil lipidique, il ressort que l'insuline est très impliquée dans le métabolisme des acides gras (*figures 3.13 et 14*). L'insuline est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Dans le métabolisme des nutriments, elle est considérée comme une hormone anabolisante, favorisant le stockage de l'excès d'énergie sous forme de triglycérides. Ceci est plus évident dans la conversion et le stockage de l'excès d'hydrate de carbone en triglycérides (Guyton et Hall, 2000). Sur le métabolisme des lipides, l'action de l'insuline tendrait également vers une conservation des lipides sous forme de triglycérides. Elle empêcherait l'utilisation des acides gras comme source d'énergie en inhibant l'activité d'enzymes rendant les acides gras disponibles comme source d'énergie. Dans la synthèse des triglycérides,

le glycérol 3-phosphate est nécessaire pour l'estérification. Le composé est généré pendant le métabolisme du glucose, lequel étant fortement influencé par l'insuline. En premier lieu, l'insuline influence le transport intracellulaire du glucose en augmentant la densité des transporteurs présents à la surface de la cellule. En second lieu, l'insuline augmente l'activité des enzymes impliquées dans son métabolisme. L'insuline peut avoir des effets à court et à long terme. L'influence de l'insuline dans le métabolisme des MCFAs relèverait probablement des effets à court terme.

En effet, dans leurs expériences, Roncero et Goodridge (1992) avaient observé que l'inhibition par les MCFAs était déjà présente 30 minutes après leur addition dans le milieu. On peut donc supposer que l'action de l'insuline serait à court terme, l'impact de l'insuline étant sur des enzymes déjà présentes dans le cytosol, favorisant leur activité métabolique par exemple par phosphorylation ou en induisant des modifications allostériques. De fait, plusieurs effets métaboliques de l'insuline, particulièrement ceux qui surviennent rapidement se font par des actions de phosphorylation et déphosphorylation sur les enzymes cibles (*Annexe B*).

Cette rapidité d'action serait également en faveur d'une interaction rapide des MCFA avec les enzymes responsables de leur métabolisme. A leur entrée dans la cellule, les acides gras sont activés par acylation. Cette étape est aussi déterminante dans le sort métabolique de l'acide gras, car elle pourrait orienter soit vers l'oxydation ou vers l'intégration dans les triglycérides et constitue aussi un moyen de régulation du transport des acides gras (Black et Dirusso, 2003). Ohkubo et ses collègues (1992) avaient observé que l'administration de la forme triglycéride des MCFAs était associée à une augmentation du processus d'acylation. Dans leurs expériences, l'octanoate et la palmitate étaient tous les deux incorporés dans les triglycérides et les phospholipides après leur activation en CoA. Cependant avec l'octanoyl CoA, il y avait une augmentation d'activité de l'octanoyl-CoA synthétase alors que le palmitate n'avait aucun effet sur l'acyl-CoA synthétase responsable de son action. Cette augmentation de l'activité de l'acyl-CoA synthétase pourrait donc résulter en un plus

grand nombre d'acides gras acylés qui seraient disponibles pour une incorporation dans les triglycérides.

4.2 Conclusion

En conclusion, l'effet synergique observé dans l'induction de la FAS en présence de la T3 et de l'insuline semble provenir d'une modification du TR et probablement de la phosphorylation du récepteur par des voies de signalisation pouvant être activées par l'insuline. Cette phosphorylation dépend cependant de la liaison de la T3 au récepteur. Les acides gras pourraient jouer potentiellement sur cet état de phosphorylation ou interagir avec des facteurs ou coactivateurs se liant au TR phosphorylé. Cela pourrait être aussi modulé par l'acétylation. Cependant, pour la phosphorylation, comme pour l'inhibition par les acides gras, le mécanisme reste encore à être élucidé. Dans la présente étude, nous avons surtout établi que le métabolisme des acides gras est nécessaire et dépendant de l'insuline. Nous avons tenté d'identifier le métabolite impliqué dans cette inhibition par les MCFAs. Les acides gras sous forme de triglycéride semblent être des bons candidats. Cependant, des études supplémentaires doivent être effectuées afin d'infirmer ou de confirmer leur potentiel inhibiteur. A cet effet, l'étude des voies métaboliques empruntées par les acides gras requièrerait l'usage d'inhibiteurs spécifiques d'enzymes impliquées dans les différentes voies comme la β -oxydation et l'estérification.

4.3 Perspectives

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser l'inhibition par les MCFAs.

Dans l'identification du métabolite impliqué, il serait d'intérêt d'établir une courbe d'évolution des différentes fractions lipidiques en fonction du temps à court et à long termes. En effet, les travaux de Goodridge et collaborateurs ont démontré que même après 30 min, on pouvait observer une inhibition par les MCFAs. Une courbe d'inhibition de la FAS par les MCFAs en fonction du temps pourrait donc être réalisée en parallèle. Il serait pertinent d'évaluer le degré d'incorporation des acides gras radioactifs dans les différentes fractions lipidiques lorsque les hépatocytes sont incubés en présence des triglycérides, de la carnitine hexanoate et de la bromohexanoate.

Dans la présente étude, le profil lipidique réalisé indique que les acides gras sous forme triglycérides sont les métabolites plausibles. Toutefois, les valeurs d'activité enzymatique enregistrées ne permettent pas de conclure. Ce manque d'inhibition pouvant résulter d'un défaut de capture, il serait nécessaire d'effectuer des études de captation des triglycérides et de la carnitine hexanoate. Toujours avec les triglycérides, il serait important d'évaluer si les MCFAs marqués qu'on retrouve dans les triglycérides sont des MCFAs non modifiés ou des MCFAs ayant subi une élongation. A cet effet, des études en spectrométrie de masse seraient utiles pour l'analyse de cette fraction lipidique. Des études avec des inhibiteurs spécifiques de voies métaboliques de la β -oxydation tels que l'étomoxir, ou de l'estérification pourraient être par la suite utilisés. Ceci serait en effet nécessaire afin de mieux caractériser l'implication de chacune de ces voies dans le métabolisme des acides gras.

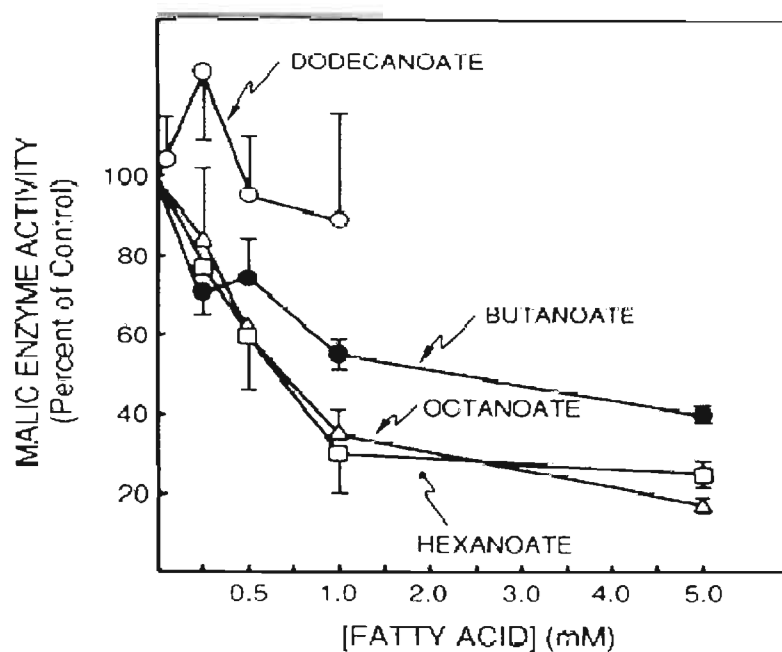
SR-B1 (Scavenger receptor class B type I), une glycoprotéine de 82kDa, est impliquée dans le métabolisme lipidique, surtout celui des lipoprotéines (Rhainds and Brissette, 2004). Sa surexpression par les cellules aurait un effet préventif contre l'athérosclérose. Les lipoprotéines contiennent des apolipoprotéines, des lipides tels que les phospholipides, le cholestérol libre, les esters de cholestérol et les triglycérides. La CD36 étant impliquée dans le transport sélectif des acides gras (Rhainds and Brissette, 2004), il serait pertinent de vérifier l'impact de SR-B1 dans celui des MCFAs. A cette fin, des études de captation pourront être effectuées sur les cellules HepG2 sur exprimant ou sous exprimant SR-B1. L'effet des MCFAs sur l'activité de la FAS pourra aussi être vérifié dans ce système.

Enfin, dans l'impact de la phosphorylation et de l'acétylation sur l'activité de la FAS, les présentes expériences indiquent qu'une sérine/thréonine est impliquée. Cependant, les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de son activité sont encore à identifier. Ceci nécessiterait l'identification des facteurs de transcription se liant au TRE et l'implication de la phosphorylation/acétylation sur ces facteurs. Des études de phosphorylation en présence et en absence d'insuline, de T3 et de MCFAs seraient indiquées afin d'élucider le rôle joué par ces différents facteurs sur l'état de phosphorylation.

L'usage des inhibiteurs de transcription tels que la cordycepine sur les stimulations T3 puis insuline et insuline puis T3 permettrait de mieux caractériser l'interaction entre la T3 et l'insuline. Il serait également important d'élucider quel est le rôle de la CBP-p300 dans la transcription.

ANNEXES

Annexe A: Effet de la concentration et de la longueur des chaînes des acides gras sur l'activité de l'enzyme malique dans des hépatocytes de poulet stimulés à la T3.



Les hépatocytes ont été isolés des foies d'embryon de poulet de 19 jours et incubés dans un milieu contenant l'insuline (50nM) et la corticostérone (1 μ M). A 20 heures d'incubation, le milieu a été changé pour un de même condition contenant la T3 (1.6 μ M) avec ou sans acides gras aux concentrations indiquées. A 68 heures d'incubation, les cellules ont été récoltées et l'activité de l'enzyme malique a été déterminée. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules stimulées dans les mêmes conditions et sans acides gras \pm écart type. ($n = 4-10$)

(tiré de Roncero et Goodridge, 1992)

**Annexe B : Enzymes dont le degré de phosphorylation et l'activité sont altérés
par l'insuline (Tirée de Denton *et al.*, 1981.)**

Enzyme or carrier	Tissue	Change in activity	Possible mechanism
Glucose uptake			
Glucose transport	W, (SM,H)	increase (V*)	? translocation
Cyclic AMP metabolism			
Phosphodiesterase (low Km)	W, L	increase (V*)	? (W) ; phosphorylation (L)
Protein kinase (Cyclic AMP dep.)	W, SM (V+in W ; Ka*in SM)	decrease	association of R and C subunits
Glycogen metabolism			
Glycogen synthase	H, SM,W,L	increase (Ks*)	dephosphorylation
Phosphorylase Kinase	L	decrease (V+)	dephosphorylation
Phosphorylase	W, L	decrease (Ka+)	dephosphorylation
Glycolysis and pyruvate oxidation			
Pyruvate Kinase	L, W	increase (Ks+ in L ; Ks* in W)	dephosphorylation (L) ? (W)
Pyruvate dehydrogenase	W, B, L (MG)	increase (V*)	dephosphorylation
Lipid metabolism			
Acetyl CoA carboxylase	W, B, L	increase (V*)	polymerisation and phosphorylation
Hydroxymethyl glutaryl CoA reductase	L	increase (V*)	dephosphorylation
Triacylglycerol lipase	W	decrease (V+)	dephosphorylation

L=foie ; MG=glande mammaire ; H=cœur ; SM= muscle squeletique ; tissu adipeux blanc (W =white), ou brun (B =Brown).

Bibliographie

1. Abumrad, N.A., el-Maghrabi M.R., Amri E.Z, Lopez E., and Grimaldi P.A., (1993) Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* **268**: 17665-17668.
2. Abumrad N., Harmon C., and Azeddine I., (1998) Membrane transport of long chain fatty acids: Evidence for a facilitated process. *J. Lipid Res.* **39**: 2309-2318.
3. Acton S.L., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., and Krieger M., (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**: 518-520.
4. Amy C.M., Witkowski A., Naggert J., Williams B., Randhawa Z., and Smith S., (1989) Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the entire rat fatty acid synthase. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* **86**: 3114-3118.
5. Astier, H., (1980) Thyroid gland in birds: Structure and function. In: Epple, A., Stetson, M.H. (Eds.), *Avian Endocrinology*. Academic Press, New York, pp167-189.
6. Azzout-Marniche D., Becard D., Guichard C., Foretz M., Ferre P., and Foufelle F., (2000) Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **350**: 389-393
7. Bach A.C., and Babayan V.K., (1982) Medium-chain triglycerides: annual update. *Am. J. Clin. Nutr.* **36**: 950-962.
8. Back D.W., Goldman M.J., Fisch J.E., Ochs R.S., and Goodridge A.G., (1986) The fatty acid synthase gene in avian liver: two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription. *J. Biol. Chem.* **261**: 4190-4197.
9. Baillie R.A., Klautky S.A., and Goodridge A.G., (1993) Transient transfection of chick-embryo hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* **4**: 431-439.
10. Berk P.D., Zhou S.L., Kiang C.L., Stump D., Bradbury M., and Isola L.M., (1997) Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in

- adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J. Biol. Chem.* **272**: 8830-8835.
11. Black P.N., and Dirusso C.C., (2003) Transmembrane movement of exogenous long chain fatty acids: Proteins, enzymes and vectorial esterification. *Microbiol. Mol. biol. Rev.* **67**: 454-472.
 12. Blake W.L., and Clarke S.D., (1991) Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J. nutr.* **12**: 1727-1729.
 13. Bradford M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
 14. Buechler K.F., and Lowenstein J.M., (1990) The involvement of carnitine intermediates in peroxisomal fatty acid oxidation: a study with 2-bromofatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**: 233-238.
 15. Butterworth H.W., Yang P.c., Bock R.M. and Porter J.W. (1967) The partial dissociation and the reassociation of the pigeon liver fatty acid synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **242**: 3508-3516.
 16. Campbell F.M., Clohessy A.M., Gordon M.J., Page K.R., and Duttaroy A.K., (1997) Uptake of long chain fatty acids by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells: role of plasma membrane fatty acid-binding protein. *J. Lipid Res.* **38**: 2558-2568.
 17. Cao G., Garcia C.K., Wyne K.L., Schultz R.A., Parker K.L., and Hobbs H.H., (1997) Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J. Biol. Chem.* **272**: 33068-33076.
 18. Cao X., Kambe F., Moeller L.C., Refetoff S., and Seo H., (2005) Thyroid hormone induces rapid activation of AKT/Protein kinase B-Mammalian Target of rapamycin-p70s6k cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol. endocrinol.* **19**: 102-112.
 19. Carlisle-Moore L., Gordon C.R., Machutta C.A., Miller W.T., and Tonge P.J., (2005) Substrate recognition by the human fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* **280**: 42612-42618.

20. Cheng S.Y., (2000) Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev. Endocrinol. Metab. disord.* **1/2**: 9-18.
21. Clarke S.D., Armstrong M.K., and Jump D.B., (1990) Nutritionnal control of rat liver fatty acis synthase and S14 mRNA abundance. *J. Nutr.* **120**: 218-224.
22. Clarke S.D., (1993) Regulation of fatty acid synthase gene expression: An approach for reducing fat accumulation. *J. Animal Sci.* **71**: 1957-1965.
23. Clarke S.D., and Jump D.B., (1994) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* **14**: 83-89.
24. Daoud G., Simoneau L., Masse A., Rassart E., and Lafond J., (2005) Expression of cFABP and PPAR in trophoblast cells: effect of PPAR ligands on linoleic acid uptake and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1687**: 181-194.
25. Dennler s., Pendaries V., Tacheau C., Costas M.A., Mauviel A., and Verrecchia F., (2005) The steroid receptor co-activator (SRC-1) potentiates TGF- β /smad signaling: role of p300/CBP. *Nature Oncogene* **24**: 1936-1945.
26. Denton R.M., Brownsey R.W., and Belsham G.J., (1981) A partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia* **21**: 347-362.
27. Dixon J.L., and Ginsberg H.N., (1993) Regulation of hepatic secretion of apolipo-protein B-containing lipoproteins: Information obtained from cultured liver cells. *J. Lipid Res.* **34**: 167-179.
28. Doiron B., Cuif M.H., Chen R., and Kahn A., (1996) Transcriptional Glucose Signaling through The Glucose Response Element Is Mediated by the Pentose Phosphate Pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 5321-5324.
29. Duckworth W.C., Bennett R.G., and Hamel F.G., (1998) Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocrine Rev.* **19**: 608-624.
30. Fleig W.E, Geering I., Roben H., and Ditschuneit H., (1984) Effects of insulin, glucagon and dexamethasone on pyruvate kinase in cultured hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **805**: 165-173.
31. Foufelle F., Girard J., and Ferre P., (1996) Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: is glucose 6-phosphate the signaling metabolite? *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 372-378.

32. Fischer P.W.F., and Goodridge A.G., (1978) Coordinate regulation of acetyl coenzyme a carboxylase and fatty acid synthetase in liver cells of the developing chick in vivo and in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 332-344.
33. Friedman M.I., Ramirez I., Bowden C. R. and Tordoff M. G. (1990) Fuel partitioning and food intake: role for mitochondrial fatty acid transport. *Am J. Physiol.* **258**: R216-R221.
34. Guyton A.C., and Hall J.E., (2000) Textbook of medical physiology, 10ème edition, W.B. Saunders company, philadelphie, USA.
35. Gavin L.A., Bui F., Mc Mahon F., and Cavalier R.R., (1980) Sequential deiodination of thyroxine to 3,3'-deiodothyronine via 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3,5'-triiodothyronine in rat liver homogenate. The effects of fasting versus glucose feeding. *J. Biol. Chem.* **254**: 49-54.
36. Glass C.K., (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* **15**: 391-407.
37. Goodridge A.G., (1973) On the relationship between fatty acid synthesis and the total activities. *J. Biol. Chem.* **248**: 1932-1938.
38. Goodridge A.G., Garay A., and Silpanata P., (1974) Regulation of lipogenesis and the total activities of lipogenic enzymes in a primary culture of hepatocytes from prenatal and early postnatal chicks. *J. Biol. Chem.* **249**: 1469-1475.
39. Goodridge A.G., and Adelman T.G., (1976) Regulation of malic enzyme synthesis by insulin, triiodothyronine and glucagons in liver cells in culture. *J. Biol. Chem.* **251**: 3027-3032.
40. Greenspan F.S., and Gardner D.G., (2001) Basic and clinical endocrinology 6th ed. Lange/McGraw-Hill p59-79 Geoffrey Zubay (1983) Biochemistry, addison-wesley.
41. Griffin M.J., and Sul H.S., (2004) Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life* **56**: 595-600.
42. Guo-Xia T., Tanen M.R., and Bagchi M.K., (1995) Ligand Modulates the Interaction of Thyroid Hormone Receptor with the Basal Transcription Machinery. *J. Biol. Chem.* **270**: 10601-10611.
43. Hadzic E., Desai-Yajnik V., Helmer E., Guo S., Wu S., Koudinova N., Casanova J., Raaka B.M., and Samuels H.H., (1995) A 10-amino-acid sequence in the N-

terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4507-4517.

44. Hillgartner F.B., Salati L.M., and Goodridge A.G., (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.* **75**: 47-76.
45. Hillgartner F.B., and Charron T., (1998) Glucose stimulates transcription of fatty acid synthase and malic enzyme in avian hepatocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **274**: 493-501.
46. Heinzel T., Lavinsky R.M., Mullen T.M., Soderstrom M., Laherty C.D., Torchia J., Yang W.M., Brard G., Ngo S.D., Davie J.R., Seto E., Eisenman R.N., Rose D.W., Glass C.K., and Rosenfeld M.G., (1997) A complex containing N-CoR, mSin3, and histone deacetylases mediates transcriptional repression. *Nature* **387**: 43-48.
47. Hirsch, D., Stahl, A., and Lodish, H. F., (1998) A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8625-8629.
48. Holzer, K.P., Liu W., and Hammes, G.G., (1989) Molecular cloning and sequencing of chicken liver fatty acid synthase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4387-4391.
49. Horlein A.J., Naar A.M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamel Y., Soderstrom M., Glass C.K., and Rosenfeld M.G., (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear co-repressor. *Nature* **377**: 397-404.
50. Horton J.D., Goldstein J.L., and Brown M.S., (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**: 1125-1131.
51. Hsu R.Y., and Yin S.L., (1970) *Biochem.* **9**: 239-245.
52. Janknecht R., and Hunter T., (1996) Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr. Biol.* **6**: 951-954.
53. Joshi V.C., and Aranda L.P., (1979) Hormonal regulation of fatty acid synthetase in cultured avian liver explants. Role of insulin. *J. Biol. Chem.* **254**: 11783-11786

54. Joshi V.C., (1981) Cultured avian liver explants for studies of lipogenic enzymes. *Met. enzymol.* **72**: 743-747.
55. Kameda K., and Goodridge A.G., (1991) Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* **266**: 419-426
56. Kanel W.B., (1985) Lipids, diabetes and coronary heart disease: insights from the framingham study. *Am. Heart J.* **110**: 1100-1107.
57. Katz N.R., and Ick M., (1981) Induction of acetyl-CoA carboxylase in primary rat hepatocyte cultures by glucose and insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**: 703-709.
58. Klandorf H., and Harvey S., (1985) Food intake regulation of circulating thyroid hormones in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**: 162-170.
59. Kohrle J., Hesch R.D., and Leonard J.L., (1991) The Thyroid. Braverman L.E., and Utiger R.D., eds. pp 144-189, lippincott, philadelphia.
60. Kotzka J., Lehr S., Roth G., Avci H., Knebel B., and Muller-Wieland D., (2004) Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**: 22404-22411.
61. Krssak M., Falk P., Dresner A., Dipietro L., Vogel S.M., Rothman D.L., Shulman G.I., and Roden M., (1999) Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* **42**: 113-116.
62. Kurtz J.W., and Wells W.W., (1981) Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase in primary cultures of adult rat hepatocytes. Requirement for insulin and dexamethasone. *J. Biol. Chem.* **256**: 10870-10875.
63. Lakshmanan M.R., Nepokroeff C.M., and Porter J.W., (1972) control of the synthesis of fatty acid synthetase in rat liver by insulin, glucagons, and adenosine 3':5'cyclic monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**: 3516-3519.
64. Lam S.K., Harvey S., and Hall T.R., (1986). In vitro release of triiodothyronine and thyroxine from thyroid glands of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 178-185.

65. Landschulz K.T., Pathak R.K., Rigotti A., Krieger M., and Hobbs H.H., (1996) Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* **98**: 984-995.
66. Latasa M.J., Griffin M.J., Moon Y.S., Kang C., and Sul H.S., (2003) Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Mol. Cell Biol.* **23**: 5896-907.
67. Leonard J.L., (1990) The thyroid Gland (M.A. Greer, ed.) pp.285-305, Raven Press, New york.
68. Limatta M., Towle H.C., Clarke S., and Jump D.B., (1994) Dietary polyunsaturated fatty acids interfere with the insulin/glucose activation of L-type pyruvate Kinase gene transcription. *Mol. endocrinol.* **8**: 1147-1153.
69. Lornitzo F.A., Qureshi A.A., and Porter J.W., (1975) Subunits of fatty acid synthetase complexes. *J. Biol. Chem.* **250**: 4520-4529.
70. Magana M.M., Koo S.H., Towle H.C., and Osborne T.F., (2000) Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 4726-33.
71. Mann G.V., (1974) The influence of obesity on health. *N. England J. Med.* **291**: 226-232.
72. Mariash C.N., Mc Swingan C.R., Towle H.C., Schwartz H.L., and Oppenheimer J.H., (1981) Glucose and triiodothyronine both induce malic enzyme in the rat hepatocyte culture. Evidence that triiodothyronine multiplies a primary glucose-generated signal. *J. Clin. Invest.* **68**: 1485-1490.
73. Massillon D., Arinze I.J., Xu C., and Bonel F., (2003) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in cultured hepatocytes and H4IIE cells by short chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **278**: 40694-40701.
74. Mayorek N., and Bar-Tana J., (1985) Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by 2-bromooctanoate in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**: 6528-6532.
75. Mc Garry J.D., and Dobbins R.L., (1999) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* **42**: 128-138.

76. Mc Garry J.D., (2002) Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 Diabetes. *Diabetes* **51**: 7-18.
77. Miyazaki M., Kim Y.C., and Ntambi J. M., (2001). A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J. Lipid Res.* **42**: 1018-1024.
78. Moustaid N., and Sul H.S., (1991) Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. *J. Biol. chem.* **266**: 18550-18554.
79. Murray K.R., Granner K.D., Mayes A.P., and Rodwell V.W., (1995) *Précis de Biochimie de Harper*, 8e édition, presses de l'universite Laval.
80. Nawaz Z., Tsai M., and O'Malley B.W., (1995) Specific Mutations in the Ligand Binding Domain Selectively Abolish the Silencing Function of Human Thyroid hormone receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11691-11695.
81. Ntambi J. M., (1992) Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **267**: 10925-10930.
82. Ntambi J. M., (1995) The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* **34**: 139-150.
83. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 1998.
84. Papamandjaris A.A., Mac Dougall D.E., and Jones P.J.H., (1998) Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications. *Life sci.* **62**: 1203-1215.
85. Perseghin G., Scifo P., Decobelli F., Pagliato E., Battezzati A., Arcelloni C., Vanzulli A., Testolin G., Pozza G., Del Maschio A., and Luzi L., (1999) Intramyocellular triglycerides content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* **48**: 1600-1606.
86. Pessin J.E., and Saltiel A.R., (2000) Signaling pathways in insulin action: Molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**: 165-169.
87. Reyns G.E., Venken K., Morreale de Escobar G., Kuhn E.R., and Darras V.M., (2003) Dynamics and regulation of intracellular thyroid hormone concentrations

- in embryonic chicken liver, kidney, brain, and blood. *Gen. comp. endocrinol.* **134**: 80-87.
88. Rhainds D., and Brissette L., (2004) The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 39-77.
 89. Roncero C., and Goodridge A.G., (1992) Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *J. Biol. Chem.* **267**: 14918-14927.
 90. Roncero C., and Goodridge A.G., (1992) Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture: Corticosterone and carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**: 258-267.
 91. Roth G., Kotzka J., Kremer L., Lehr S., Lohaus C., Meyer H.E., Krone W., and Muller-Wieland D., (2000) MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J. Biol. Chem.* **275**: 33302-33307.
 92. Rufo C., Garcia T., Nakamura M.T, Koo S.H, Towle H.C., and Clarke S.D (2001) Involvement of a Unique Carbohydrate-responsive Factor in the Glucose Regulation of Rat Liver Fatty-acid Synthase Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* **276**: 21969-21975.
 93. Sato R., Yang J., Wang X., Evans M.J., Ho Y.K., Goldstein J.L., and Brown M.S., (1994) Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J. Biol. Chem.* **269**: 17267-17273.
 94. Sessler A.M., and Ntambi J.M., (1998) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* **128**: 923-926.
 95. Spence J.T., Pitot H.C., and Zalitis G., (1979) Regulation of ATP-citrate lyase in primary cultures of adipocytes. *J. Biol. Chem.* **254**: 12169-12173.
 96. Stahl A., Evans J.G., Pattel S., Hirsch D., and Lodish H.F., (2002) Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell* **2**: 477-488.
 97. Stapleton S.R., Mitchell D.A., Salati L.M., and Goodridge A.G., (1990) Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick

- embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify the effect. *J. Biol. Chem.* **265**: 18442-18446.
98. Stoops J.K., Arslanian M.J., Yang H.O., Aune K.C., Vanaman T.C., and Wakil S.J., (1975) Presence of two polypeptide chains comprising fatty acid synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1940-1944.
 99. Stoops J.K., and Wakil, S.J., (1981) The yeast fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* **256**: 8364-8370.
 100. Stoops J.K., Singh N., and Wakil S.J., (1990) The yeast fatty acid synthetase. *J. Biol. Chem.* **265**: 16971-16977.
 101. Sugawara A., Yen P.M, Darling D.S, and Chin W.W., (1993) Characterization and tissue expression of multiple triiodothyronine receptor-auxiliary proteins and their relationship to the retinoid X-receptors. *Endocrinology* **133**: 965-971.
 102. Sul H.S., Latasa M.J., Moon Y., and Kim K.H., (2000) Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J. Nutr.* **130**: 315S-320S.
 103. Swierczynski J., Mitchell D.A., Reinhold D.S., Salati L.M., Stapleton S.R., Klautky S.A., Struve A.E., and Goodridge A.G., (1991) Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step. *J. Biol. Chem.* **266**: 17459-17466.
 104. Thurmond D.C., Baillie R.A., and Goodridge A.G., (1998) Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **273**: 15375-15381.
 105. Toussant M.J., Wilson M.D., and Clarke S.D., (1981) Coordinate suppression of acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase by polyunsaturated fat. *J. Nutr.* **111**: 146-153.
 106. Tsukamoto Y., Wong H., Mattick J.S., and Wakil S.J., (1983) The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **258**: 15312-15322.
 107. Uete T., and Tsuchikura H., (1972) Autoregulatory system of insulin degradation in liver. *J. Biochem.* **72**: 157-163.

108. Vaulont S.A., Munnich J-F.D., and Khan A., (1986) Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J. Biol. Chem.* **261**: 7621-7625.
109. Visser T.J., (1988) Hormones and their action, Part I (B.A. Cooke, R.J.B. King, and H.J. Van der Molen, eds.) pp.81-103, Elsevier, Amsterdam.
110. Wagner R.L., Apriletti J.W., McGrath M.E., West B.L., Baxter J.D., and Fletterick R.J., (1995) A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**: 690-697.
111. Wajchenberg B.L., (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **21**: 697-738.
112. Wakil S.J., Stoops J.K., and Joshi V.C., (1983) Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 537-579.
113. Wang Y., Voy B.J, Urs S., Suyeon K., Soltani-Bejnood M., Quigley N., Heo Y.R., Standridge M., Andersen B., Dhar M., Joshi R., Wortman P., Taylor J.W., Chun J., l Leuze M., Claycombe K., Saxton A.M., and Naima M.M., (2004) The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are co-ordinately regulated in human adipose tissue. *J. Nutr.* **134**: 1032-1038.
114. Waters K., and Ntambi J. M., (1994) Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in liver of diabetic mice. *J. Biol. Chem.* **269**: 27773-27777.
115. Waters K.M., Miller C.W., and Ntambi J.M., (1997) Localization of a Negative Thyroid Hormone-Response Region in Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase Gene 1. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **233**: 838-843.
116. Wen G., Tianguang L., Tong W., Barbara E.c., and Han J., (2003) Octnoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and Human adipocytes. *J. Nutr.* **133**: 2512-2518.
117. Wilson E.J., and Mc Murray W.C., (1981) Regulation of malic enzyme and mitochondrial α -glycero-phosphate dehydrogenase by thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **256**: 11657-11662.
118. Wilson S.B., Back D.W., Morris S.M., Swierczynski and Goodridge A.G., (1986) Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps. *J. Biol. Chem.* **261**: 15179-15182.

119. Witowski A., Naggert J., Mikkelsen J., and Smith S., (1987) Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the acyl carrier protein and its flanking domains in the mammalian fatty acid synthetase. *Eur. J. Biochem.* **165**: 601-606.
120. Xiao D.W., Sato R., Brown M.S., Hua X., and Goldstein J.L., (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77**: 53-62.
121. Xiong S., Chirala S., Hsu M., and Wakil S.J., (1998) Identification of thyroid hormone response element in the human fatty acid synthase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **21**: 12260-12265.
122. Yen P.M., Feng X., Flamant F., Chen Y., Walker R.L., Weiss R.E., Chassande O., Samarut J., Refetoff S., and Meltzer P.S., (2003) Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO rep.* **6**: 581-587.
123. Zhang B.B., (2002) Insulin signaling and action: Glucose, lipids, proteins. *Endotext.com.editeurs: Ira D.G., and Rushakoff R.J.*
124. Zhang J., and Lazar M.A., (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Ann. Rev. Physiol.* **62**: 439-466.
125. Zhang X.K., Willis K.N., Graupner G., Tzukerman M., Hermann T., and Pfahl M., (1991) Ligand binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles. *New Biol.* **3**: 169-181.
126. Reference internet: www.nysaes.cornell.edu/flavornet/smells.html.26k.
127. Yahagi N., Shimano H., Hasty A.L., Amemiya-Kudo M., Okazaki H., Tamura Y., Lizuka Y., Shionoiri F., Ohashi K., Osuga J.I., Harada K., Gotoda T., Nagai R., Ishibashi S., and Yamada N., (1999) A crucial role of sterol regulatory element binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **274**: 35840-35844.